

Untersuchungen über die lichtabhängige Glukoseverwertung in Chlorella-Kulturen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Dietrich Lesemann
aus Lemgo

Göttingen 1966



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544303_0060

Untersuchungen über die lichtabhängige Glukoseverwertung in Chlorella-Kulturen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Dietrich Lesemann
aus Lemgo

Göttingen 1966



D 7

Referent: Professor Dr. A. Pirson

Korreferent: Prof. Trebst

Tag der mündlichen Prüfung: 10. 11. 66

I n h a l t:

	<u>Seite</u>
I. <u>Einleitung</u>	1
II. <u>Material und Methoden</u>	4
A. Algenmaterial	4
B. Kulturmedien	4
C. Anzuchtapparate	5
D. Bestimmungsmethoden	6
III. <u>Versuche und Ergebnisse</u>	8
A. <u>Die Beziehung zwischen Wachstum und Photosynthese-Hemmung in aerober Glukosekultur</u>	8
1. Der Einfluß von Manganentzug	8
2. Der Einfluß von DCMU	13
3. Der Einfluß von rotem und blauem Licht	18
a) Normalkulturen	18
b) Kulturen mit gehemmter Photosynthese	23
B. <u>Das Wachstum von Glukosekulturen bei gleichzeitigem Entzug von Sauerstoff und Kohlendioxid</u>	30
1. Die Abhängigkeit des Wachstums bei Chlorella vulgaris von der photosynthetischen O ₂ -Produktion	30
2. Die Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit bei Chlorella vulgaris von der Sauerstoffkonzentration	39
3. Die Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit bei Chlorella vulgaris von der Beleuchtungsstärke	44
4. Vergleich zwischen Chlorella vulgaris und Chlorella pyrenoidosa	45
IV. <u>Diskussion</u>	49
V. <u>Zusammenfassung</u>	55
VI. <u>Literaturverzeichnis</u>	57

I. Einleitung

Bei vergleichenden Stoffwechseluntersuchungen an Algen stößt man auf eine sehr große Variabilität der Ernährungsformen. So unterscheidet man autotrophe, amphitrophe, mixotrophe und heterotrophe Stoffwechseltypen (PRINGSHEIM 1959). Die Übergänge zwischen den verschiedenen Typen sind fließend und eine exakte Einordnung eines bestimmten Organismus bereitet oft Schwierigkeiten¹⁾. Besonderes Interesse verdienen bei Algen solche Fälle, in denen ein photoheterotropher Stoffwechsel, wie er in photosynthetischen Bakterien (z.B. *Rhodospirillum*, STANIER und Mitarb. 1959) verwirklicht ist, aufzutreten scheint; bei diesen Bakterien erfolgt das Wachstum unter anaeroben Bedingungen unter Verwertung einer organischen Kohlenstoffquelle nur im Licht. Beispiele für Algen mit einem sehr ähnlichen Ernährungstyp sind *Chlamydothrix* (PRINGSHEIM und WIESSNER 1960, 1961; WIESSNER 1962b) und *Chlamydomonas mundana* (EPPLEY, GEE, and SALTMAN 1963), bei denen von einer lichtabhängigen Acetat-Assimilation berichtet wird. Diese Algen weisen im Licht eine sehr langsame CO_2 -Reduktion, dagegen eine sehr aktive Acetat-Assimilation auf. Der Photosyntheseapparat baut hier also selbständig nur in geringem Ausmaß Kohlenstoffgerüste aus CO_2 auf; er kann aber die Assimilation von Acetat beträchtlich steigern. Die fördernde Wirkung des Lichtes ist mit einer Energielieferung aus dem Photosyntheseapparat erklärt worden. Als spezieller Mechanismus hierfür gilt die zunächst an isolierten Chloroplasten charakterisierte (Übersicht siehe ARNON 1960), dann aber auch in vivo nachgewiesene (SIMONIS und GRUBE 1953; KANDLER 1954; MACLACHLAN and PORTER 1959; TAYLOR 1960; BISHOP 1961; FORTI and PARISI 1963) zyklische Photophosphorylierung.

1) Da wir im folgenden oft von mixotrophen Bedingungen sprechen werden, sei hier kurz definiert, daß wir darunter ein gleichzeitiges Angebot von organischem Substrat und Licht verstehen. Nach PRINGSHEIM (1966) ist eine Alge vom mixotrophen Stoffwechseltyp dadurch gekennzeichnet, daß sie "nicht ohne organische Zusatznahrung neben der Kohlensäure-assimilation auskommt, obgleich sie mit einem anscheinend ausreichenden Photosyntheseapparat ausgestattet ist".

Nicht nur bei der Acetatverwertung so spezifisch angepasster Organismen, wie der Acetatflagellaten, sondern auch bei der Assimilation von Glukose in photosynthetischen Chlorellen wirkt sich das Licht unter anaeroben Bedingungen über die Energielieferung aus der Photophosphorylierung fördernd aus (Übersicht bei TANNER und Mitarb. 1965). Damit ist gezeigt, daß der Photosyntheseapparat außer der CO_2 -Fixierung auch in dieser Alge noch andere wichtige Prozesse in der Zelle unterhalten kann. Die anaerobe zyklische Photophosphorylierung wurde nur in kurzfristigen Experimenten unter speziellen Versuchsbedingungen nachgewiesen; so gibt es noch keine Anhaltspunkte für die Rolle dieses Prozesses bei Wachstumsvorgängen. Nach der von BLOCH (1962) gegebenen Zusammenstellung treten bei allen untersuchten höheren Pflanzen im Gegensatz zu Bakterien Syntheseschritte auf, die obligatorisch O_2 -abhängig sind. So erschien es von vornherein fraglich, ob Algen wie *Rhodospirillum* vollständig anaerob nur mit Hilfe der zyklischen Photophosphorylierung auf organischem Substrat wachsen können. Man weiß, daß z.B. *Chlorella* unter niedrigsten O_2 -Partialdrucken bei Belichtung sofort mit einer O_2 -Produktion beginnen kann (SPRUIT 1962; DAMASCHKE und Mitarb. 1955). WIESSNER und GAFFRON (1964) haben auch tatsächlich nachgewiesen, daß *Chlamydomonas* unter anaeroben Bedingungen dann nicht mehr wächst, wenn die photosynthetische O_2 -Produktion durch DCMU unterbunden wird. Das heißt, bei anaeroben Außenbedingungen kann diese Alge nur wachsen, weil sie mit Hilfe der photosynthetischen O_2 -Produktion ihren aeroben Stoffwechsel aufrechterhält. Auch für die Photoreduktion, die zunächst als weiteres Beispiel für einen anaeroben Ernährungstyp angesehen wurde (Übersicht bei SPRUIT 1962), wird in letzter Zeit sehr fraglich, ob unter streng anaeroben Bedingungen ein Wachstum erfolgen kann.

Da die Acetat-Assimilation nicht unter anaeroben Bedingungen stattfindet, gewinnt die Frage nach der anaeroben Glukose-Assimilation von *Chlorella* besonderes Interesse. *Chlorella vulgaris* zeigt nach BERGMANN (1955) unter anaeroben Außenbedingungen ein schnelles, lichtabhängiges

Wachstum. Die Verhältnisse sind hier aber kompliziert, weil in aeroben Kulturen bei Hemmung der photosynthetischen O_2 -Entwicklung durch Manganentzug eine unerwartet starke Beeinträchtigung der Trockengewichtsproduktion, die in Dunkelkulturen fehlt, beobachtet wird. Da die zyklische Photophosphorylierung durch Manganentzug nicht blockiert wird (siehe ARNON 1960; BADOIR 1961), muß bei der Glukoseverwertung hier noch eine weitere Lichtwirkung im Spiele sein. Man vermutete, daß im Licht die Glukoseverwertung über einen lichtspezifischen Weg verläuft, der bei Hemmung der Photosynthese mit blockiert wird. Zusätzlich schien Belichtung in dieser Alge eine Sperre der für den Dunkelstoffwechsel kennzeichnenden oxydativen Glukose-Assimilation zu bewirken. Es läßt sich bei den Befunden von BERGMANN nicht entscheiden, ob hier tatsächlich ein besonderer Weg der Lichtverarbeitung von Glukose im Spiele ist oder ob die beobachteten Phänomene indirekt zustandekommen. In der vorliegenden Arbeit wird daher, ausgehend von den Befunden BERGMANNs, versucht, die Verarbeitung von Glukose im Licht durch Chlorella eingehender zu charakterisieren.

II. Material und Methoden:

A. Algenmaterial:

Folgende Stämme aus der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Institutes in Göttingen wurden verwendet:

Chlorella vulgaris Beijerinck Stamm 211/11 h¹⁾

Chlorella pyrenoidosa Chick Stamm 211/8 b²⁾

Die Stammkulturen wurden in flüssigem, mineralischem Medium mit Zusatz von 0,1% Bactopepton in Reagenzgläsern angezogen. Impfmateriel für die Versuche lieferten am Ende der logarithmischen Wachstumsphase stehende Kulturen des jeweils gewünschten Ernährungstyps. Die Impfmenge wurde meist so gewählt, daß eine Anfangskonzentration von 5 µg Gesamtstickstoff /ml in den Kulturansätzen vorlag. Um Stickstoffmangelerscheinungen auszuschließen, wurden die schnellwachsenden Kulturen nur bis zur 72. Stunde analysiert. Es wurde ausschließlich unter sterilen Bedingungen gearbeitet.

B. Kulturmedien:

Die Grundzusammensetzung des mineralischen Mediums ist bei KUHLE (1962) angegeben. In den vorliegenden Versuchen wurde die dreifache Menge an Phosphaten zugesetzt, um die Pufferung zu verbessern. Für die Versuche mit Ammoniumnährlösung wurde KNO₃ ersetzt durch (NH₄)₂HPO₄ und die fehlende Kaliummenge in Form von KCl zugefügt. Stickstoffmangelnährlösung wurde ohne KNO₃ angesetzt und ebenfalls Kalium in Form von KCl zugegeben. Manganmangelnährlösung ergab sich durch Weglassen des MnSO₄. Die DCMU-Konzentration (3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff) betrug in der Nährlösung 10⁻⁵ M. Die Zugabe erfolgte aus einer wässrigen, 10⁻³-molaren Suspension, in der durch Erhitzen und schnelles Abkühlen sehr kleine Kristalle erzeugt wor-

1) Synonym: *Chlorella regularis* var. *aprica* var. nov.; Indiana Algal Culture Collection No 263 (SHIHIRA and KRAUSS 1963).

2) Synonym: *Chlorella fusca* var. *vacuolata* var. nov.; Indiana Algal Culture Collection No 251 (SHIHIRA and KRAUSS 1963).

den waren. Die Glukosenährlösung enthielt 1% Glukose. Es wurden analysenreine Chemikalien und über Austauscher gereinigtes Wasser verwendet.

Die komplette Nährlösung wurde in den zur Kultur verwendeten Sterilröhren (KUHLE und LORENZEN 1964) autoklaviert. Für Farblichtkulturen wurden die kleineren, bei KOWALLIK (1962) beschriebenen normalen Kulturröhren benutzt. Sie erhielten im Gaseinleitungsrohr einen Wattepfropf und wurden trocken sterilisiert. Die autoklavierte Nährlösung wurde dann im Impfkasten eingefüllt.

C. Anzuchtapparate:

Drei verschiedene Kulturanlagen wurden verwendet:

1. Für Vorkulturen und Kulturen im Weißlicht und im Dunkel der bei KUHLE und LORENZEN (1964) angegebene Lichtthermostat.
2. Für Farblichtversuche der bei KOWALLIK (1962) beschriebene Lichtthermostat kleineren Formats.
3. Für Versuche mit anaerober Begasung der von WIESSNER (1960) beschriebene Lichtthermostat. Hier wurde der Gasstrom (80% N_2 und 20% H_2) durch folgenden Kreislauf geleitet: aus einem Mischgefäß, das die Verbindung mit den Vorratsflaschen von N_2 und H_2 herstellte, saugte eine "Aeromat"-Membranpumpe (Typ AL/15) das Gas an und drückte es durch einen Trockenturm mit $CaCl_2$ in einen Deoxo-Gasreiniger (Firma Heraeus, Modell D). Hier wurden Sauerstoffspuren katalytisch bis auf ca. 1 ppm (Angabe der Firma) entfernt. Das so von O_2 gereinigte Gas wurde zur Entfernung von CO_2 und zur Beladung mit Wasserdampf durch eine Gaswaschröhre mit KOH (20%) und eine zweite mit Wasser geleitet. Zur Entfernung von CO_2 wurde teilweise auch ein mit Natronasbest gefülltes Rohr verwendet. Die Abwesenheit von CO_2 wurde mit $Ba(OH)_2$ überprüft. Nach Passieren der Kulturröhren kam der Gasstrom in das Mischgefäß zurück. Die Versuche über die Abhängigkeit des Wachstums von der Sauerstoffkonzentration wurden im offenen Gasstrom durchgeführt.

Die jeweilige O_2 -Konzentration ließ sich durch Mischung von Preßluft und Stickstoff mit Hilfe von Strömungsmessern einstellen.

Alle anderen Versuche wurden mit einem Luft- CO_2 -Gemisch (1,5 Vol.-% CO_2) begast. Die Versuchstemperatur betrug $25^\circ C$.

Die Beleuchtung erfolgte in den Lichtthermostaten 1 und 3 mit Leuchtstoffröhren der Firma Philips (drei TL 40 W-1/32 Warmton de Luxe, zwei TL 40 W-1/55 Tageslicht), deren Abstand von den Kulturröhren variabel war. Die Beleuchtungsstärke betrug, wenn nicht anders angegeben, 5000 Lux. Die Beleuchtungseinrichtung des Lichtthermostaten 2 hat KOWALLIK (1962) ausführlich beschrieben. Rotes und blaues Kulturlicht wurde im größten Teil der Farblichtversuche mit Energien eingestrahlt, die bei autotrophen Blaulicht-Kulturen um etwa 20% geringere Produktivität als im Rotlicht, etwas unterhalb des Bereiches der Lichtsättigung des Wachstums, erzielen. Die eingestrahlten Energiemengen betragen nach Messungen mit einem Bolometer¹⁾ im Rot $3,1 \times 10^5 \text{ erg/cm}^2 \text{ xsec}$ und im Blau $3,6 \times 10^3 \text{ erg/cm}^2 \text{ xsec}$. Bei einigen Versuchen wurde Blaulicht mit einer Energie von $5,3 \times 10^3 \text{ erg/cm}^2 \text{ xsec}$ eingestrahlt. Diese Beleuchtung erzielt die gleiche Produktivität wie das verwendete Rotlicht.

D. Bestimmungsmethoden:

Folgende Größen wurden zur Charakterisierung der Kulturen gemessen:

- 1.) Gesamtstickstoff (Bestimmung mit der Mikro-Kjeldahl-Methode; Faktor zur Berechnung der Proteinwerte: 6,25 nach SPOEHR und MILNER 1949). Da nach RUPPEL (1962) die stickstoffhaltigen Nichteisweißverbindungen der Zellen einen recht konstanten und relativ niedrigen Anteil am Gesamtstickstoff ausmachen, wird im folgenden der Gesamtstickstoffgehalt als Maß für den Proteingehalt der Zellen betrachtet.
- 2.) Gesamtkohlenhydrate (Bestimmung modifiziert nach ROE 1955)
- 3.) Glukosegehalt des Mediums (Bestimmung nach NELSON 1944).

1) Herrn Dr. W. Wiessner sei für die Ausführung der Messungen gedankt.

- 4.) Trockengewicht (Bestimmung nach der bei KOWALLIK 1962 beschriebenen Methode).
- 5.) Zellzahl (Auszählung mit der Zählkammer nach THOMA (neu)). Der relativen Zellzahl 1 entsprechen in absoluter Angabe 15600 Zellen pro Milliliter.
- 6.) Bei anaerober Begasung mußte der Sauerstoffgehalt des Gases überprüft werden. Hierzu wurde eine Kulturröhre mit dem Elektrodensystem Zink/Goldamalgam für die elektrochemische Sauerstoffmessung nach TÖDT (1958) ausgerüstet. Sie enthielt die beiden Elektroden in Phosphatpuffer und wurde wie die anderen Kulturröhren begast. Der Meßstrom ist dem Sauerstoffgehalt des Phosphatpuffers proportional und dieser wiederum bei Gleichgewichtseinstellung dem O_2 -Gehalt des Gasstromes. Die Empfindlichkeit der verwendeten Anordnung war für unsere niedrigsten O_2 -Konzentrationen nicht ausreichend. Es ließen sich erst Werte von über 5×10^{-2} Vol.-% O_2 im Gas (Konzentration des ungereinigten Flaschenstickstoffes) sicher nachweisen. Das Meßsystem wurde daher nur zur Überwachung des anaeroben Kreislaufes gegen umfangreichere Erhöhungen des O_2 -Gehaltes eingesetzt. Im übrigen diente es in einer Versuchsserie zur Einstellung höherer O_2 -Konzentrationen. Die Eichung der Meßanordnung erfolgte nach Ausschaltung des Deoxo-Gasreinigers im Kreislauf von bekanntem Volumen durch Einspritzen bekannter Luftmengen. Die Angabe der Herstellerfirma über die Leistungsfähigkeit des Deoxo-Gasreinigers ließ sich mit Hilfe einer Leuchtbakterienkultur überprüfen. Nach Angaben von HARVEY und MORRISON (1924) fangen Leuchtbakterien bei einer O_2 -Konzentration von ungefähr 7 ppm gerade an zu leuchten. Unser Gasgemisch ließ das Leuchten bis auf einen minimalen Rest, der bei langer Adaptation gerade noch erkennbar blieb, erlöschen. Die Begasung dürfte also einen O_2 -Gehalt von maximal 10 ppm (gleich 10^{-4} Vol.-%) aufgewiesen haben¹⁾.

1) Eine Reinkultur von Leuchtbakterien wurde freundlicherweise vom Mikrobiologischen Institut der Universität Göttingen zur Verfügung gestellt.

III. Versuche und Ergebnisse:

A. Die Beziehung zwischen Wachstum und Photosynthese-Hemmung in aerober Glukosekultur:

Für die Klärung der Frage nach dem Verarbeitungsweg der Glukose in mixotropher Kultur ist das Verhalten der Algen bei gehemmter Photosynthese wichtig. Eine Schwierigkeit bei Untersuchungen in dieser Richtung bestand früher darin, daß Manganentzug der einzige bekannte Weg war, die photosynthetische O_2 -Entwicklung auf so spezifische Weise zu hemmen, daß in parallelen Dunkelkulturen keine Beeinträchtigung des Wachstums auftritt. Seit 1956 (WESSELS and VAN DER VEEN; siehe auch BISHOP 1958) bietet der Hemmstoff DCMU eine weitere Möglichkeit, die photosynthetische Sauerstoffentwicklung und die CO_2 -Reduktion sehr spezifisch, und dabei vollständiger als dies durch Manganentzug erreicht werden kann, zu unterbinden. Es erschien außerdem lohnend, die von ULRICH (1963) eingehender für *Euglena* dargestellte Auswirkung des Manganmangels auf den Umsatz exogener Glukose im Licht auch bei *Chlorella* zu verfolgen. So wurde das Problem noch einmal unter Verwendung der beiden Möglichkeiten einer spezifischen Photosynthesehemmung bearbeitet. In *Chlorella pyrenoidosa* und *Chlorella vulgaris* standen zwei Algenarten mit unterschiedlicher Tendenz zur Heterotrophie zur Verfügung. So wurde die Klärung der Beziehung zwischen dem bei Photosynthese-Hemmung resultierenden Wachstum und dem Dunkelwachstum dadurch erleichtert, daß wir den jeweils beobachteten Effekt bei diesen beiden Algenarten vergleichen konnten.

1.) Der Einfluß von Manganentzug

Die Bedeutung des Mangans für den Stoffwechsel der Pflanzen ist seit McHARGUE (1922) nachgewiesen (Übersicht bei WIESSNER 1962a). PIRSON (1937) zeigte zum ersten Mal, daß Manganmangel bei einzelligen Grünalgen zu einer starken, aber zunächst reversiblen Hemmung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung führt (vgl. PIRSON, TICHY und WILHELM 1952). Beim Wachstum von Algen im Dunkeln mit organischem Substrat und bei photosynthetischen Bakterien liegt der Man-

ganbedarf um den Faktor 100-1000 niedriger als der Bedarf der Photosynthese grüner Pflanzen. Die benötigten Mangangen sind dann so gering, daß ohne besondere Reinigungsmaßnahmen auch bei Verwendung analysenreiner Chemikalien keine Mangelsymptome auftreten (REISNER and THOMPSON 1956; EYSTER, BROWN, TANNER and HOOD 1958; WIESSNER 1960).

Während also in unseren heterotrophen Kulturen ein Manganmangel nicht in Erscheinung tritt (Abb. 1; die geringe Beeinträchtigung des Wachstums der hier dargestellten Mangelkulturen war in anderen Experimenten nicht vorhanden), weisen mixotrophe Kulturen den gleichen Manganbedarf auf wie autotrophe. Wird ihnen das Mangan entzogen, so resultiert daraus erstaunlicherweise nicht, daß solche Kulturen im Licht so schnell wachsen wie im Dunkeln. Vielmehr ist die Trockengewichtsproduktion weit unter die Werte heterotropher Kulturen gesenkt (BERGMANN 1955; siehe auch Abb. 1 C). Analysiert man die Zusammensetzung solcher Algen, so ergibt sich, daß der Manganmangel den Proteinhaushalt zunächst wenig beeinträchtigt, daß vielmehr besonders der Kohlenhydratspiegel gesenkt wird (ULRICH 1963; siehe auch Abb. 1 A und 1 B). In unseren Versuchen mit glukoseernährten Algen war immer wieder festzustellen, daß der Verlauf der Trockengewichtskurve im wesentlichen mit dem der Kohlenhydrat-Kurve korreliert ist (Abb. 1 B und 1 C). Aus diesem Grunde wird im folgenden auf die Darstellung der Trockengewichtswerte verzichtet.

Die Glukoseentnahme aus dem Medium wird nun ausführlicher dargestellt, um die charakteristischen Unterschiede zwischen *Euglena* und *Chlorella* aufzuzeigen. Bei *Euglena* weisen Normal- und Manganmangelkulturen einen gleich hohen Verbrauch exogener Glukose auf; trotzdem erleiden die Mangelkulturen eine Erniedrigung des Kohlenhydratspiegels. Daraus ergeben sich für die Mangelzellen sehr hohe Werte des Verhältnisses von Glukoseaufnahme zu Kohlenhydratgehalt. Dieses Ergebnis wurde als Hinweis auf eine in Mn-Mangelzellen durch Licht gesteigerte Veratmung von exogener Glukose angesehen (ULRICH 1963).

Auch bei *Chlorella* ist ein verringerter Kohlenhydratgehalt im Manganmangel zu beobachten; im Unterschied zu *Euglena* entspricht diesem hier aber eine stark gehemmte Glukoseauf-

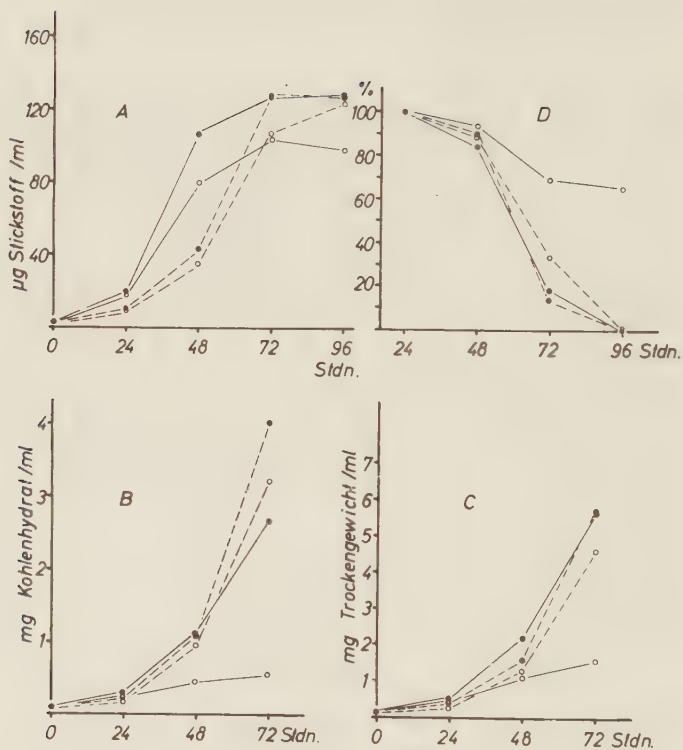


Abb.1

Die Auswirkung von Manganentzug auf Glukosekulturen von *Chlorella vulgaris*. A: Gesamtstickstoff; B: Gesamtkohlenhydrat; C: Trockengewicht; D: Glukosespiegel im Medium.

●—●	normal	} Licht
○—○	ohne Mangan	
●- - -●	normal	} Dunkel
○- - -○	ohne Mangan	

nahme aus dem Medium (Abb. 1 D, vgl. auch BERGMANN 1955). Mixotrophe Kulturen mit Mangan haben nach 5 Tagen die angebotene Glukose verbraucht; genauso verhalten sich Dunkelkulturen unabhängig von der Manganversorgung. Zum gleichen Zeitpunkt haben die Mangelkulturen im Licht noch nicht die Hälfte der Glukose aufgenommen. Trotz der Hemmung der absoluten Glukoseaufnahmewerte liegt hier wie bei *Euglena* eine höhere Glukoseaufnahme als in Normalkulturen vor, bezogen auf den jeweiligen Kohlenhydratgehalt. In Abb. 2 sind nun für den Gesamtstickstoff, die Kohlenhydrate und die Glukoseaufnahme jeweils die prozentualen Daten gehemmter Kulturen bezogen auf Normalkulturen aufgetragen. Da in den Manganmangelkulturen deutlich die Proteinsynthese weniger als die Glukoseaufnahme und diese wieder weniger als der Kohlenhydratzuwachs gehemmt ist, muß gefolgert werden, daß im Manganmangel bei *Chlorella vulgaris* pro verbrauchte Glukose mehr Protein und weniger Gesamtkohlenhydrat aufgebaut wird als in normalen Kulturen. Aus diesen Ergebnissen ist eine erhöhte Veratmung von Glukose im Manganmangel nicht zu erschließen.

Noch in einer zweiten Hinsicht unterscheiden sich *Chlorella* und *Euglena*. Während *Chlorella* im Licht nur im Manganmangel eine Hemmung der Glukoseaufnahme zeigt, verbleiben bei Belichtung von *Euglena* in Normal- und Mangelkulturen etwa 50% der Glukose im Medium. Im Dunkeln wird unabhängig von der Manganversorgung die Glukose vollständig verbraucht.

Die Darstellung der Manganmangelkulturen wird hier abgeschlossen. Die schon bekannte Sperre der Glukoseverwertung im Licht wurde reproduziert, und die Beschreibung des Phänomens um den Befund erweitert, daß im Gegensatz zu *Euglena* bei *Chlorella* die Glukoseaufnahme im Manganmangel gegenüber Normalkulturen im Licht gehemmt wird. Im folgenden Abschnitt wird die Auswirkung der Photosynthesehemmung durch DCMU an mixotrophen Kulturen untersucht.

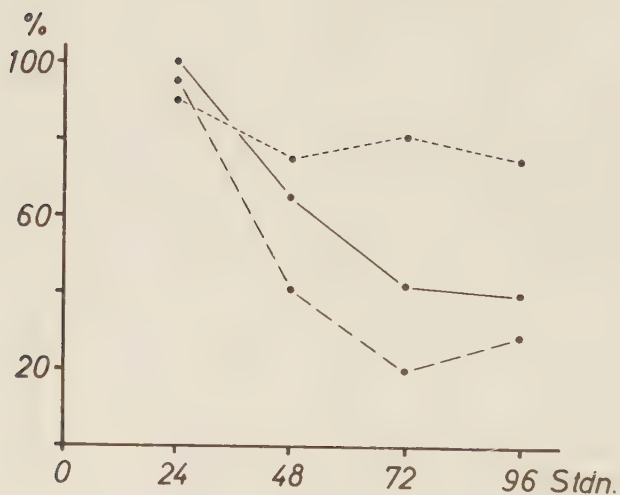


Abb. 2

Mixotrophe Kultur von *Chlorella vulgaris*. Prozentualer Anteil der Daten von Manganmangelkulturen bezogen auf Normalkulturen.

- Glukoseentnahme aus dem Medium
- Gesamtstickstoff
- - - - ● Gesamtkohlenhydrat

2.) Der Einfluß von DCMU

DCMU blockiert die nichtzyklische Elektronentransportkette der Photosynthese zwischen der 2. und der 1. Lichtreaktion. Damit unterbindet es die Produktion von Sauerstoff und Reduktionsäquivalenten aus Wasser (Übersicht bei LOSADA und ARNON 1963). Das zyklische Elektronentransportsystem wird höchstens teilweise beeinträchtigt (ARNON und Mitarb. 1964; TANNER und Mitarb. 1966; WIESSNER mündl. Mitt.). In niedriger Konzentration wirkt das Gift sehr spezifisch nur auf den Photosyntheseapparat ein. In höherer Konzentration führt es zu einer leichten Entkopplung der Glukoseatmung mit erhöhter Sauerstoff- und verringerter Glukoseaufnahme. Bei der von uns verwendeten Konzentration von 10^{-5} M dürfte nach TANNER, DÄCHSEL und KANDLER (1965) die Verringerung der oxydativen Glukoseassimilation nicht über den Betrag von 10-15% hinausgehen. Andererseits ist nach GINGRAS und LEMASSON (1965) erst bei einer Konzentration von 10^{-5} M die O_2 -Entwicklung in allen Lichtintensitäten vollständig blockiert. Das Wachstum unserer Glukosekulturen wird im Dunkeln durch die verwendete DCMU-Konzentration so wenig beeinträchtigt, daß die Wirkung gegenüber den großen Unterschieden im Licht zu vernachlässigen ist (Abb. 3 und 4). Dagegen zeigten autotrophe Kulturen unter diesen Bedingungen vollständige Wachstumshehmung.

Die Abbildungen 3 A und 4 A zeigen anhand der Gesamtstickstoffwerte das verschieden schnelle Wachstum der beiden von nun an verglichenen Algenarten im Dunkeln unter heterotrophen Bedingungen. Belichtung erhöht das Wachstum der beiden um verschiedene Beträge, so daß unter mixotrophen Bedingungen beide Arten bei der hier verwendeten Beleuchtungsstärke annähernd gleiche Zunahme an Gesamtstickstoff aufweisen. DCMU-Kulturen nun zeigen auch im Licht nur etwa die Stickstoffzunahme heterotropher Kulturen. Die belichteten Kulturen erfahren also durch die Photosynthese-Hemmung eine Erniedrigung der Stickstoffzunahme um etwa die gleichen Beträge, um die ungehemmte Lichtkulturen gegenüber Dunkelkulturen gefördert werden. Die beiden Algenarten zeigen geringe Unterschiede: bei DCMU-gehemmter *Chlorella pyrenoidosa* ist

im Licht die Proteinsynthese nur wenig, bei *Chlorella vulgaris* dagegen etwas mehr erhöht gegenüber der Proteinsynthese im Dunkeln. Da bei beiden Algen eine gleichsinnige Reaktion auftritt, ist die Möglichkeit ausgeschaltet, daß die Entsprechung der Proteinsynthese von heterotrophen Dunkelkulturen und DCMU-gehemmten Lichtkulturen zufällig ist.

Die Auswirkung der DCMU-Hemmung auf die Proteinsynthese erinnert insofern an die Verhältnisse im Manganmangel, als auch dort zunächst die Depression der Proteinsynthese nicht unter die Werte heterotropher Kulturen führt. In DCMU-Kultur von *Chlorella vulgaris* wird ebenfalls wie bei Manganentzug der Kohlenhydratspiegel der Zellen und die Glukoseaufnahme aus dem Medium bis unter die Werte der Dunkelkulturen erniedrigt (Abb. 3 B, C und 4 B). DCMU-gehemmte Licht-Kulturen von *Chlorella pyrenoidosa* zeigen auch erniedrigte Kohlenhydratwerte gegenüber Dunkel, sie weisen aber die gleiche Glukoseaufnahme wie Dunkelkulturen auf (Abb. 4 C).

Es sei noch auf einen Unterschied zwischen der Auswirkung von DCMU und von Manganmangel auf die Proteinsynthese hingewiesen. Während DCMU sofort eine gleichbleibende Wirkung entfaltet, verschärft sich der Manganmangel mit zunehmender Kulturdauer. In den Mangelkulturen ist der Kohlenhydratspiegel schon zu Anfang erniedrigt, die Proteinsynthese ist jedoch zunächst weniger gehemmt als in DCMU-Kulturen. Nach einem Maximum am 4. Tage tritt aber im Manganmangel eine Erniedrigung des Proteinspiegels ein, so daß am Ende nicht die gleichen Protein-Absolutwerte wie in Normalkulturen erreicht werden (Abb. 1 A). DCMU-gehemmte Kulturen dagegen weisen zwar eine deutliche Erniedrigung der Proteinzunahmerate auf, sie erreichen aber die gleichen Proteinendwerte wie Normalkulturen (Abb. 3 A, bei *Chlorella pyrenoidosa* wegen der langen Verzögerung des Anstieges nicht dargestellt). Es ist danach anzunehmen, daß DCMU dauernd und durchaus spezifisch in den Stoffwechsel eingreift, während Manganentzug nur anfänglich ähnlich wie DCMU wirkt.

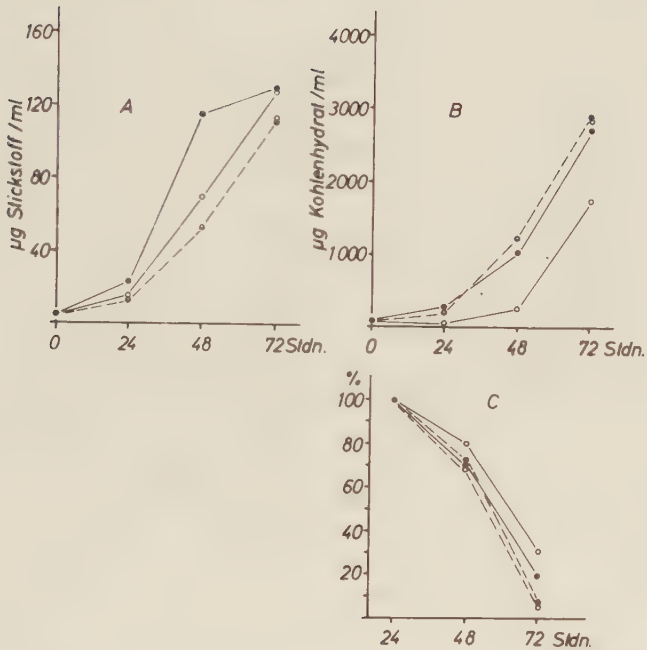
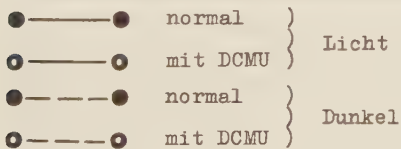


Abb. 3

Die Auswirkung von DCMU auf Glukosekulturen von *Chlorella vulgaris*.

A: Gesamtstickstoff; B: Gesamtkohlenhydrat; C: Glukosespiegel im Medium.



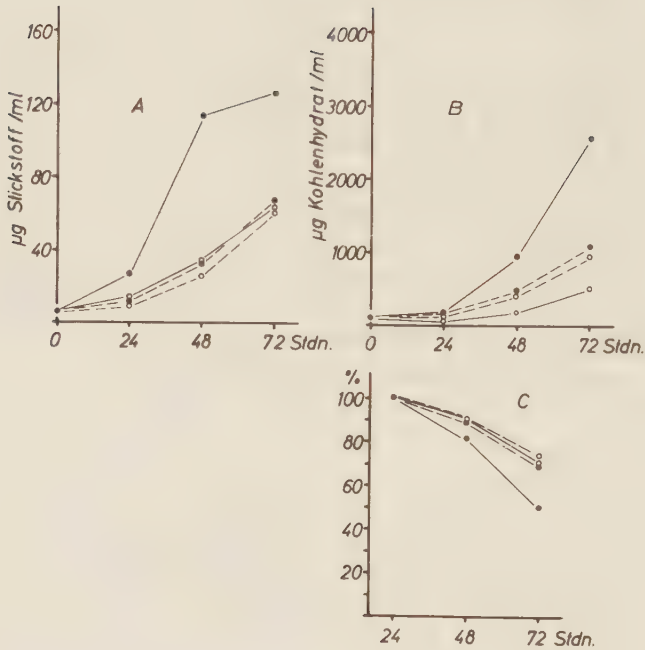


Abb. 4

Die Auswirkung von DCMU auf Glukosekulturen von *Chlorella pyrenoidosa*.

A: Gesamtstickstoff; B: Gesamtkohlenhydrat;

C: Glukosespiegel im Medium.

- | | | |
|-------------|----------|----------|
| ● ——— ● | normal | } Licht |
| ○ ——— ○ | mit DCMU | |
| ● - - - - ● | normal | } Dunkel |
| ○ - - - - ○ | mit DCMU | |

Der Anstieg der Algenkonzentration scheint zu einer Verschärfung des Manganmangels zu führen, die eine zusätzliche Beeinträchtigung weiterer Stoffwechselprozesse zur Folge hat.

Trotz der aufgezeigten Unterschiede zwischen den Versuchen mit Manganentzug und mit DCMU lassen sich die Ergebnisse so zusammenfassen, daß beide Methoden der Photosynthesehemmung in mixotroph ernährten Algen die Proteinsynthese in voraussehbarem Ausmaß erniedrigen, dagegen eine unerwartet starke Beeinträchtigung des Kohlenhydratstoffwechsels herbeiführen. Als Erklärung für die Sperre der Glukoseverarbeitung wurde zunächst angenommen (PIRSON 1958; siehe auch ULRICH 1963), daß infolge einer Konkurrenz zwischen Photosyntheseapparat und manganabhängigen Prozessen des Dunkelstoffwechsels die letzteren trotz ihres geringen Manganbedarfes gehemmt würden, sobald bei Belichtung der Photosyntheseapparat alles verfügbare Mangan an sich reißt. Da nun DCMU die gleiche Hemmung zur Folge hat wie Manganentzug, ist diese Möglichkeit ausgeschlossen. Eine Konkurrenz um Mangan kann aber angenommen werden, um die nur in späten Stadien des Manganmangels nur im Licht auftretende zusätzliche Wachstums hemmung zu erklären.

Die Sperre der Kohlenhydratverarbeitung stellt dagegen eine direkte Folge der Belichtung bei Photosynthesehemmung dar. Es läßt sich nicht entscheiden, ob das Licht seinen Einfluß auf die Verwertung exogener Glukose über den Photosyntheseapparat direkt ausübt oder ob unabhängig von der Photosynthese eine Lichtwirkung auf Prozesse der Kohlenhydratverarbeitung im Spiele ist. So mußte versucht werden, die Hemmung der Glukoseverwertung und die Photosynthesehemmung voneinander zu trennen. Da bei Grünalgen schon ein Einfluß verschiedener Spektralbereiche auf die Zusammensetzung der Zellen als vom Photosyntheseapparat unabhängiger Effekt bekannt ist (KOWALLIK 1962), wurde mit Hilfe der von KOWALLIK verwendeten Spektralbereiche roten und blauen Lichtes geprüft, ob im Farblight eine spezifische Wirkung auf die Verwertung exogener Glukose hervortritt.

3.) Der Einfluß von rotem und blauem Licht:

a) Normalkulturen:

Die Wirkung von Licht verschiedener Spektralbereiche auf die Zusammensetzung von synchronisierten, autotrophen Kulturen von *Chlorella pyrenoidosa* (211/8b) ist von KOWALLIK (1962) eingehend untersucht worden. KOWALLIK (1965, 1966) teilt auch Erfahrungen an Farblichtkulturen glukoseernährter Algen mit. Er findet in autotrophen und mixotrophen Blaulichtkulturen gegenüber Rotlicht eine Erhöhung des Proteinspiegels, die von der eingestrahlten Blaulichtenergie abhängig ist. Die von KOWALLIK benützte Methode bietet die Möglichkeit, in mixotroph kultivierten Algen durch Licht verschiedener Spektralbereiche gezielt eine Änderung in der Zusammensetzung hervorzurufen.

Unser Ziel ist die Analyse der Lichtwirkung auf die Glukoseverwertung. Dazu stellen wir die Veränderungen im Gehalt an Protein (gemessen am Gesamtstickstoff) und Kohlenhydraten und der Aufnahme exogener Glukose in Abhängigkeit von der Belichtung der Kulturen mit den von KOWALLIK verwendeten breiten Spektralbereichen roten und blauen Lichtes dar. Wir verwenden dabei weitgehend die gleichen Kulturbedingungen wie KOWALLIK.

Die Abbildungen 5 und 6 zeigen die Unterschiede zwischen glukoseernährten Normalanzuchten der beiden Algenarten in rotem und blauem Farblicht. Beide Arten weisen bei Belichtung sowohl mit Rot als auch mit Blau eine Steigerung der Proteinsynthese gegenüber Dunkelkulturen auf. Im Blaulicht ist aber bei beiden Algen die Proteinsynthese noch gegenüber der im Rotlicht leicht gefördert. Der absolute Betrag dieser Förderung ist bei *Chlorella pyrenoidosa* größer als bei *Chlorella vulgaris*. Wir betrachten am Beispiel von *Chlorella pyrenoidosa*, die auch den Untersuchungen von KOWALLIK zugrunde lag, und bei der die Förderung der Proteinsynthese am deutlichsten zu erkennen ist, die Veränderung der Zellzusammensetzung an den Absolutwerten der ein-

zelnen Größen. Dabei wird klar, daß einer Erhöhung des Proteinspiegels im Blau gegenüber Rot von durchschnittlich 20% eine gleichzeitige Erniedrigung des Kohlenhydratspiegels um 50% gegenübersteht (Abb. 6, A und B). Bezieht man den Proteingehalt auf den Gehalt an Kohlenhydraten (Quotient KH/P), so wird also eine Erhöhung der Proteinsynthese zum Teil nur vorgetäuscht; in Wirklichkeit ist die beobachtete Veränderung in der Zellzusammensetzung in erster Linie auf die Erniedrigung des Kohlenhydratspiegels zurückzuführen.

Dem niedrigen Kohlenhydratspiegel im Blaulicht entspricht eine ebenfalls stark verringerte Glukoseentnahme aus dem Medium (Abb. 5 C und 6 C). Bei *Chlorella vulgaris* führt dies so weit, daß der Kohlenhydratspiegel und die Glukoseaufnahme im Blaulicht nicht nur niedriger als im Rotlicht, sondern auch als im Dunkeln sind. Bei *Chlorella pyrenoidosa* ist zwar auch eine Hemmung gegenüber Rotlicht vorhanden, Blaulichtkulturen nehmen aber mehr Glukose auf als im Dunkeln.

Bei Betrachtung der unterschiedlichen Glukoseaufnahme bei den Arten ist zu beachten, daß ein Vergleich zwischen Absolutwerten nur dann sinnvoll ist, wenn die verglichenen Größen die einzigen Variablen des betrachteten Systems sind. Dies ist hier nicht der Fall. Zwar ist, besonders deutlich bei *Chlorella vulgaris*, ein hemmender Einfluß des Blaulichtes auf die Glukoseentnahme aus dem Medium zu erkennen, immer ist aber gleichzeitig die Proteinsynthese durch die Belichtung gefördert. Die Erhöhung der Proteinsynthese muß einer Hemmung des Glukoseverbrauchs entgegenwirken, sie eventuell sogar aufheben. Unterschiede müssen sich auch daraus ergeben, daß die Wachstumsförderung durch Belichtung bei beiden Algen verschieden hohe Anteile an der gesamten Proteinsynthese ausmacht. Als exakteres Maß der Aufnahmefähigkeit für Glukose sehen wir daher den Glukoseschwund aus dem Medium bezogen auf den gleichzeitigen Proteinzuwachs an. Tabelle I gibt ein Beispiel für die dann vorliegenden Verhältnisse.

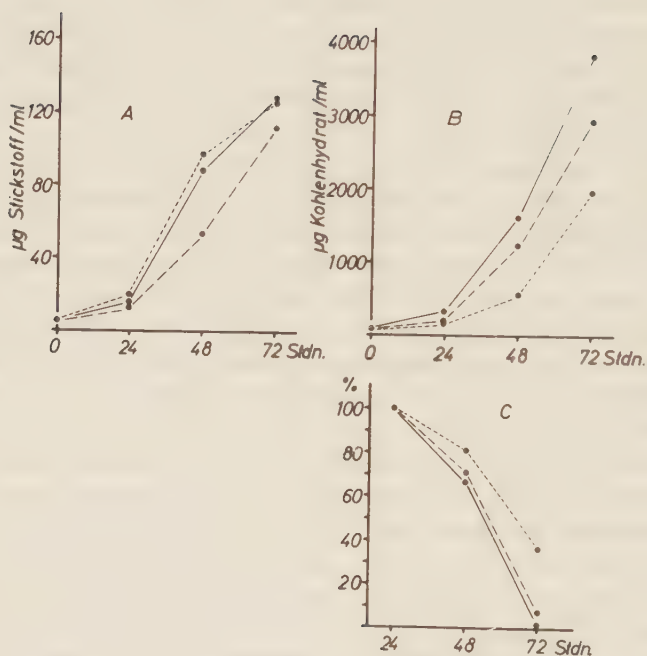


Abb. 5

Glukosekulturen von *Chlorella vulgaris*
in rotem und blauem Farblight.

A: Gesamtstickstoff; B: Gesamtkohlenhydrat;

C: Glukosespiegel im Medium.

Lichtenergien: rot $3,1 \times 10^5 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$

blau $3,6 \times 10^3 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$

● — — — ● dunkel

● — — — ● rot

● - - - - - ● blau

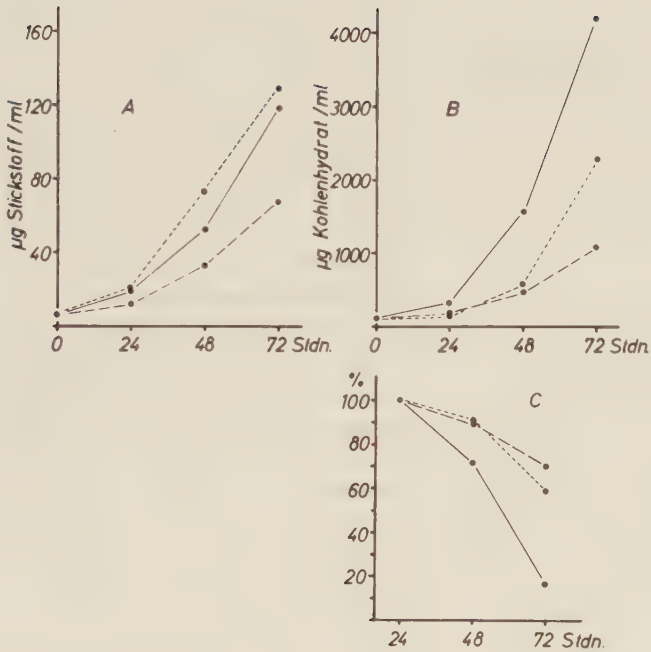


Abb. 6

Glukosekulturen von *Chlorella pyrenoidosa* in rotem und blauem Farblicht.

A: Gesamtstickstoff; B: Gesamtkohlenhydrat;

C: Glukosespiegel im Medium.

Lichtenergien: rot $3,1 \times 10^5$ erg/cm².sec

blau $3,6 \times 10^3$ erg/cm².sec

- — — — — — ● dunkel
- — — — — — ● rot
- - - - - - ● blau

Tabelle I: Glukoseaufnahme ($\mu\text{g/ml}$) pro Proteinzuwachs ($\mu\text{g/ml}$) zwischen der 24. und der 48. Stunde nach Versuchsbeginn.

	Rot	Blau	Dunkel
<i>Chlorella vulgaris</i>	7,4	3,7	10,7
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	12,2	2,4	7,7

In *Chlorella vulgaris* liefern schon die Absolutwerte den Beweis für die Hemmung der Glukoseaufnahme durch Blaulicht (Abb. 5 C). Die Werte der Tabelle I lassen erkennen, daß ebenso in *Chlorella pyrenoidosa* Blaulicht eine Verringerung der Glukoseaufnahmerate gegenüber Dunkel bewirkt. Daß absolut gesehen *Chlorella pyrenoidosa* im Blaulicht mehr Glukose verbraucht als im Dunkeln, ist folgendermaßen zu verstehen. Blaulicht erniedrigt zwar die Aufnahmerate, gleichzeitig erhöht es aber das Wachstum (Proteinsynthese) so stark gegenüber Dunkel, daß der Glukoseverbrauch für diese Wachstumserhöhung trotz verringerter Aufnahmerate größere Absolutmengen als in Dunkelkulturen umfasst. Die Richtigkeit dieser Annahme wird durch folgenden Versuch bewiesen, bei dem die Algen zur Unterbindung der Proteinsynthese in stickstoff-freies Medium übertragen wurden.

Zellen einer drei Tage alten mixotrophen Weißlichtkultur von *Chlorella pyrenoidosa* wurden unter einmaligem Waschen in stickstofffreier Nährlösung aufgenommen und im Farblight bzw. im Dunkeln weiterkultiviert. Die Kohlenhydratzunahme und die Glukoseaufnahme wurden einen Tag lang verfolgt. Nach FOGG (1959) ist bei so kurzfristigem Entzug der Stickstoffquelle noch keine schwerwiegende Schädigung der Algen z.B. in Bezug auf die Photosynthese oder auf die Atmung zu erwarten. Die Erhöhung der Tendenz zur Kohlenhydratspeicherung stört unsere Fragestellung nicht. Die Abbildung 7 zeigt klar, daß bei gehemmter Proteinsynthese in *Chlorella pyrenoidosa* sowohl die Kohlenhydrathäufung als auch die Glukoseaufnahme im Blaulicht gegenüber Rot und gegenüber Dunkel gehemmt sind.

Bemerkenswert ist an dem Resultat des Stickstoffmangelversuches (Abb.7) der Unterschied zwischen den Kulturen im Rotlicht und denen im Dunkeln. Die Rotlichtkultur verbraucht weniger Glukose aus dem Medium als die Dunkelkultur, zeigt aber einen höheren Kohlenhydratspiegel. Dieses Phänomen hängt sicherlich damit zusammen, daß die Photosynthese zusätzlich zur exogenen Glukose noch C-Gerüste liefert und außerdem mit Hilfe der Lichtphosphorylierungen eine bessere Ausnützung der Glukose ermöglicht. Interessant ist, daß bei Rotlichtbestrahlung unter diesen Bedingungen die Aufnahme exogener Glukose gegenüber Dunkel erniedrigt wird.

In diesem Zusammenhang sei noch auf folgenden methodischen Punkt hingewiesen. Mit Ausnahme des hier beschriebenen Stickstoffmangel-Versuches wurde mit einer Blaulichtenergie gearbeitet, die in autotropher Kultur eine um 20% geringere Trockengewichtsproduktion als das verwendete Rotlicht erzielt. Wir haben uns überzeugt, daß keine Unterschiede zwischen dem hier dargestellten, mit produktionsgleichen Energien durchgeführten Versuch und Parallelansätzen mit der sonst verwendeten Lichteinstrahlung bestehen.

b) Kulturen mit gehemmter Photosynthese:

Nachdem beschrieben wurde, welche Veränderungen Licht verschiedener Wellenlänge in mixotroph ernährten Kulturen hervorruft, soll nun die Wirkung der gleichen Beleuchtung auf photosynthese-gehemmte Kulturen untersucht werden. Wir wollen dabei die Vermutung nachprüfen, daß das eingangs beschriebene Phänomen der Lichtsperrre in der Glukoseverarbeitung in photosynthese-gehemmten Kulturen auf die allgemein zu beobachtende Hemmwirkung blauen Lichtes bei der Glukoseverwertung zurückzuführen ist.

DCMU hemmt in Rot- und Blaulichtkulturen die Proteinsynthese ganz ähnlich wie im Weißlicht (Abb. 8 A und § A, vgl. Abb. 4 A und 5 A). Dabei kommen durch stärkere Auswirkung der Hemmung die Blaulichtkulturen den Dunkel-

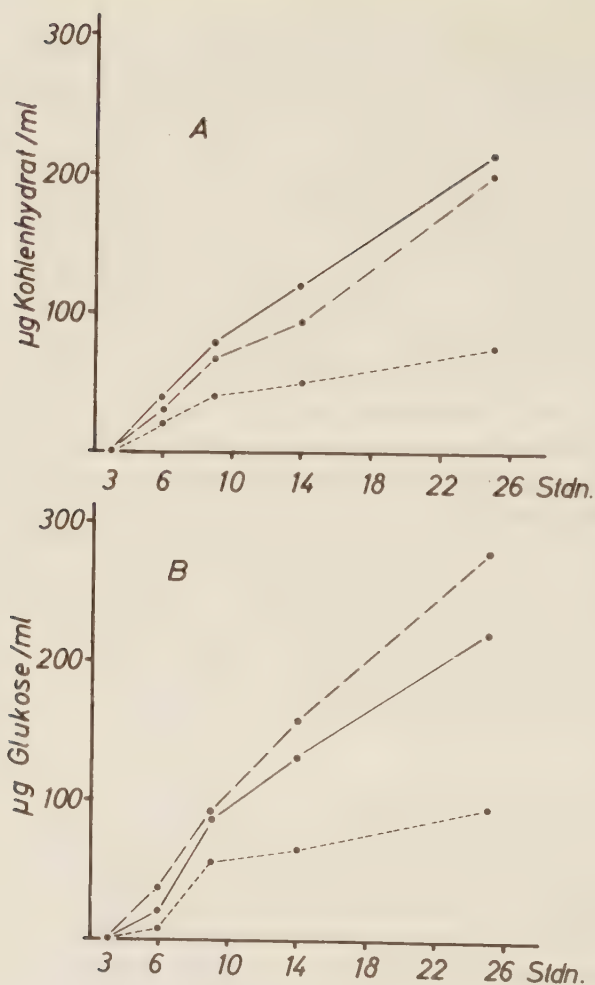


Abb. 7

Glukosekultur von *Chlorella pyrenoidosa* in rotem und blauem Farblicht bei Entzug der Stickstoffquelle.

A: Zunahme der Gesamtkohlenhydrate

B: Aufgenommene Glukosemenge

- — — — ● dunkel
- — — — ● rot
- - - - - ● blau

Lichtenergien:

rot $3,1 \times 10^5$ erg/cm² .sec

blau $5,3 \times 10^3$ erg/cm² .sec

werten näher als die Rotlichtkulturen. Betrachtet man die Kohlenhydratwerte, so zeigt sich, daß diese durch Blaulicht in gleicher Weise erniedrigt werden wie durch Weißlicht, während Rotlicht unwirksam ist. Im Rotlicht liegen die Kohlenhydratwerte der DCMU-gehemmten Kulturen nicht niedriger als im Dunkeln, sondern, besonders ausgeprägt bei *Chlorella pyrenoidosa*, sogar über diesen. In Bezug auf die Glukoseaufnahme gilt das Gleiche wie für Kulturen ohne DCMU. *Chlorella vulgaris* zeigt deutlich die Hemmung durch Blaulicht, hier noch gegenüber Normalkulturen verstärkt, während bei *Chlorella pyrenoidosa* im Dunkeln und im Blaulicht gleich hohe Werte vorliegen. Die Tabelle II zeigt, daß auch hier pro Zuwachs an Protein mehr Glukose im Rot und im Dunkel aufgenommen wird als im Blau.

Tabelle II: Glukoseaufnahme ($\mu\text{g/ml}$) pro Proteinzuwachs ($\mu\text{g/ml}$) in DCMU-gehemmten Kulturen zwischen der 24. und 48. Stunde nach Versuchsbeginn.

	Rot	Blau	Dunkel
<i>Chlorella vulgaris</i>	7,5	4,3	8,3
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	6,7	5,6	7,5

Die von DCMU-gehemmten Kulturen erhaltenen Befunde ließen sich auch bei Manganentzug nachweisen. Da hier wieder, und zwar in Rot- und Blaulicht, der schon in Weißlichtkulturen beobachtete Effekt auftritt, daß die Hemmung durch Manganentzug über die entsprechende Wirkung von DCMU hinausgeht, ist das Bild unübersichtlicher als in DCMU-Kulturen. Unabhängig von diesem Nebeneffekt ist aber auch hier die besonders starke Erniedrigung der Kohlenhydratwerte im Blaulicht vorhanden, während im Rotlicht die Hemmung gegenüber Dunkel weitgehend aufgehoben ist.

Unsere bisherigen Ergebnisse sollen nun kurz zusammengefasst werden, bevor der zweite Teil der Arbeit dargestellt wird. Wir gehen der Frage nach, ob im Licht die Glukose auf einem lichtspezifischen Weg mit Hilfe des Photosyntheseapparates assimiliert wird oder ob auch im Licht die oxydative Assimilation der Glukose stattfindet.

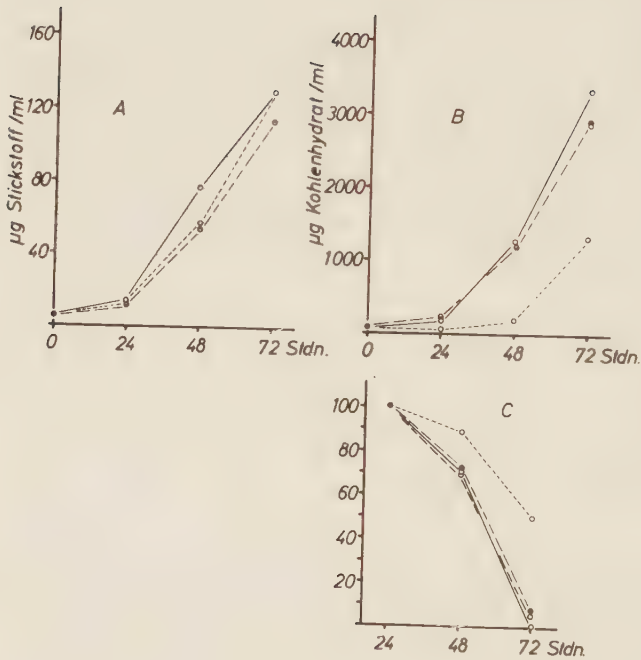


Abb. 8

Glukosekulturen von *Chlorella vulgaris* in rotem und blauem Farblicht bei Zusatz von DCMU.

A: Gesamtstickstoff; B: Gesamtkohlenhydrat;

C: Glukosespiegel im Medium.

- | | | |
|---------------|------------------|---|
| ○ — — — — ○ | dunkel | Lichtenergien: |
| ○ — — — — ○ | rot | rot $3,1 \times 10^5$ erg/cm ² .sec |
| ○ - - - - - ○ | blau | blau $3,6 \times 10^3$ erg/cm ² .sec |
| ● — — — — ● | dunkel ohne DCMU | |

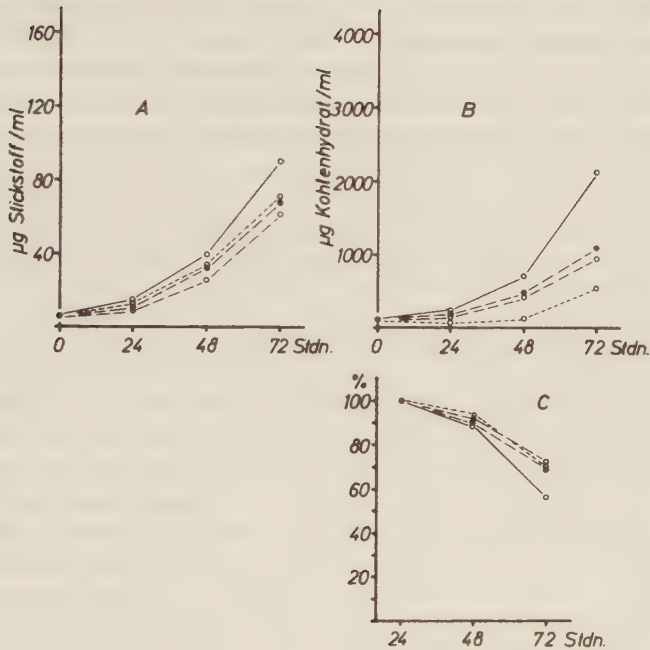


Abb.9

Glukosekulturen von *Chlorella pyrenoidosa* in rotem und blauem Farblicht bei Zusatz von DCMU.

A: Gesamtstickstoff; B: Gesamtkohlenhydrat;

C: Glukosespiegel im Medium.

- — — — — ● dunkel Lichtenergien:
 ● — — — — ● rot rot $3,1 \times 10^5$ erg/cm².sec.
 ● - - - - - ● blau blau $3,6 \times 10^3$ erg/cm².sec
 ● — — — — ● dunkel ohne DCMU

Hemmt man in mixotrophen Kulturen durch Manganentzug oder DCMU die photosynthetische O_2 -Entwicklung, so geht die Proteinsynthese etwa auf die Werte von Dunkelkulturen, in denen keine Hemmwirkung beobachtet wird, zurück. Der Kohlenhydratspiegel ist dagegen gegenüber Dunkelkulturen stark erniedrigt; ebenso ist die Glukoseentnahme aus dem Medium herabgesetzt. Nach diesem Ergebnis mußte der Eindruck entstehen, daß bei Hemmung der Photosynthese der Mechanismus der oxydativen Glukoseassimilation im Licht nicht ungehindert benützt werden kann; denn sonst dürfte eine Hemmung der Photosynthese den Kohlenhydratspiegel nicht unter die Dunkelwerte senken. Die Zellen scheinen also im Licht die Glukose nur über einen Weg assimilieren zu können, der zugleich mit der Hemmung der photosynthetischen O_2 -Entwicklung blockiert wird (siehe BERGMANN 1955).

Unsere weiteren Ergebnisse führen nun zu einer anderen Deutung des Phänomens. Der wichtigste Unterschied in der Zusammensetzung photosynthese-gehemmter, mixotroph gezogener Algen und Algen aus Dunkelkultur besteht in der extremen Erniedrigung des Kohlenhydratgehaltes im Licht bezogen auf die Proteinwerte. Wir können nun zeigen, daß auch in nicht gehemmten Kulturen das Licht eine gleichsinnige Erniedrigung des Kohlenhydratgehaltes bewirkt. Tabelle III gibt zur Veranschaulichung für die 48. Stunde nach Versuchsbeginn unter den verschiedenen von uns untersuchten Kulturbedingungen die Werte des Quotienten KH/P an (siehe auch KOWALLIK 1965).

Tabelle III: Zusammensetzung (Quotient Kohlenhydrat/Protein) von Chlorella pyrenoidosa in Glukosekultur bei verschiedener Beleuchtung. Stand: 48 Stunden nach Versuchsbeginn.

1. Normalkultur	Dunkel	Weiß	Blau	Rot
Chlorella vulgaris	3,7	1,45	0,95	2,9
Chlorella pyrenoidosa	2,3	1,32	1,27	4,8
2. Kultur mit DCMU				
Chlorella vulgaris	3,6	0,70	0,58	2,7
Chlorella pyrenoidosa	2,5	0,87	0,64	2,9

Die Erniedrigung des Kohlenhydrat-Gehaltes tritt in den nicht gehemmten Kulturen nicht so deutlich an den Absolutwerten in Erscheinung wie in photosynthese-gehemmten Kulturen, weil die nicht gehemmten Algen durch ihre Photosynthese eine Wachstumssteigerung erfahren, so daß ihr Kohlenhydrat-Gehalt pro Suspensionsvolumen im Licht höher liegt als im Dunkeln, obwohl der Kohlenhydrat-Gehalt bezogen auf Protein durch die Belichtung erniedrigt wurde. Der relativ niedrige Kohlenhydrat-Spiegel tritt aber in belichteten Kulturen unabhängig davon auf, ob die photosynthetische O_2 -Entwicklung stattfindet oder nicht.

Die weitere Untersuchung ermöglichte uns, die Wirkung des verwendeten Weißlichtes auf seinen Anteil am blauen Spektralbereich zurückzuführen. Verwendet man reines Blaulicht, so wird die Beeinträchtigung der Glukoseverwertung in ungehemmten Kulturen von *Chlorella vulgaris* schon an den Absolutwerten der Kohlenhydrate erkennbar. Hier wird noch deutlicher, daß die Sperre der Glukoseverwertung auch in Kulturen mit intakter Photosynthese vorliegt. Bestrahlt man dagegen mit reinem Rotlicht, so ist eine Hemmwirkung auf die Glukoseassimilation nicht nachweisbar. Photosynthese-gehemmte Rotlichtkulturen sind etwa genauso kohlenhydratreich wie Dunkelkulturen; sie wachsen auch etwa gleich schnell.

Da im Rotlicht die Sperre der Glukoseassimilation fehlt, wissen wir, daß auch bei Belichtung die oxydative Glukoseassimilation stattfinden kann. Nicht Belichtung allgemein, sondern nur blaues Licht hemmt die Glukose-Assimilation. Der besonders niedrige Kohlenhydrat-Spiegel bei Photosynthese-Hemmung im Weißlicht geht also auf eine Hemmung der oxydativen Assimilation zurück, und nicht auf die Hemmung einer lichtspezifischen Glukoseassimilation. Das Phänomen der Lichtsperre der Glukoseassimilation bei Photosynthese-Hemmung kann also nicht als Hinweis auf eine lichtspezifische Glukoseassimilation angesehen werden. Mit diesen Ergebnissen können wir aber nicht die Möglichkeit ausschließen, daß unter speziellen Bedingungen die oxydative Assimi-

lation nicht doch durch lichtspezifische Prozesse ersetzt werden könnte. Im folgenden Teil der Arbeit haben wir dies für den Fall untersucht, daß die oxydative Assimilation durch O_2 -Entzug unterbunden wird.

B. Das Wachstum von Glukosekulturen bei gleichzeitigem Entzug von Sauerstoff und Kohlendioxid:

1.) Die Abhängigkeit des Wachstums von Chlorella vulgaris von der photosynthetischen Sauerstoffproduktion:

Während sich bisher nur BERGMANN (1955) (siehe auch NEISH 1951 und ULRICH 1963) eingehend mit dem Wachstum glukose-ernährter Algen im Licht unter O_2 -Entzug beschäftigt hat, wurde die Glukoseverwertung im Dunkel bei Anaerobiose schon ausführlicher untersucht. Glukose wird von Chlorella unter diesen Bedingungen vergoren, dabei wechselt der Gärungstyp von Stamm zu Stamm (Zusammenstellung bei GIBBS 1962). Bei Chlorella vulgaris stellten SYRETT and WONG (1963) eine ausgesprochene Mischgärung mit verschiedensten Endprodukten fest (Essigsäure, Milchsäure, Ameisensäure, CO_2 , H_2 und Äthanol). Berechnet man aus dem Glukoseumsatz der Gärung die dabei für die Algen ausnutzbaren Energiemengen, so ergibt sich, daß schon aus Gründen der Energieversorgung kein Wachstum zu erwarten ist, das mit dem aeroben Kulturen vergleichbar wäre (GIBBS 1962). Auch in unseren Versuchen bestätigte sich die Erfahrung, daß gärende Chlorellakulturen nicht wachsen (Abb. 13, siehe auch Abb. 14).

Nach BERGMANN (1955) können O_2 - und CO_2 -frei begaste Kulturen bei Belichtung wachsen. Wir konnten dieses Ergebnis reproduzieren, stellten aber fest, daß dies nur unter bestimmten Bedingungen gilt. Bei sauerstofffreier Begasung wird nämlich das Wachstum der Algen von der Begasungsgeschwindigkeit und von der Algendichte abhängig.

BERGMANN begaste seine Kulturen mit 5 Liter Stickstoff in der Stunde. Auch wenn 25 Liter pro Stunde unsere Kulturen durchströmten, zeigten die Algen noch gutes Wachstum; dieses unterblieb dagegen, wenn etwa 50 Liter pro Stunde verwendet wurden (Abb.11). Auch bei 25 l/h konnte außerdem das Wachstum schon gehemmt werden, wenn die Algenkonzentration herabgesetzt wurde (Abb.12).

Gerade durch Variation der Algendichte läßt sich der Übergang von Bedingungen, die gutes Wachstum gestatten, zu solchen, die es unterbinden, gut demonstrieren. Abbildung 12 zeigt, daß kleine Unterschiede in der Impfdichte, die sich in parallel angesetzten aeroben Kulturen sehr wenig auswirken, in Kulturen mit O_2 -freier Begasung ausgeprägte Verzögerungen der Wachstumsgeschwindigkeit zur Folge haben. Die Anfangsphase langsamen Wachstums ist umso ausgedehnter, je niedriger die anfängliche Suspensionsdichte gehalten wird.

Verschieden dicht beimpfte Kulturen benötigen also eine verschieden lange Zeit, um die Algenkonzentration zu erreichen, bei der schnelleres Wachstum einsetzen kann. Unterschiede in der Anfangsdichte von etwa 30% entscheiden schon, ob eine Kultur überhaupt zu wachsen beginnt oder nicht. Werden zu wenige Algen eingeimpft, so sterben die Kulturen nach längerer Zeit ab.

Die in Dunkelkulturen bei O_2 -Entzug beobachtete Wachstumshemmung wird auch während der Belichtung immer dann festgestellt, wenn die Suspension besonders stark von O_2 -freiem Gas durchströmt wird oder wenn nur eine geringe Algendichte herrscht; das heißt nur dann, wenn ein besonders intensiver O_2 -Entzug gewährleistet ist. Damit haben wir den Beweis erbracht, daß auch im Licht ein Sauerstoffbedarf der Algen für das Wachstum mit Glukose besteht. Die Glukoseverwertung mit Hilfe des Lichtes kann also die oxydative Assimilation zumindest nicht vollständig ersetzen. Im Effekt erscheint in Lichtkulturen der O_2 -Bedarf des Wachstums gegenüber Dunkelkulturen erheblich herabgesetzt.

Im folgenden wurde nachgeprüft, ob in den Kulturen, die bei O_2 -freier Begasung im Licht wachsen, photosynthetisch gebildeter O_2 das Wachstum unterhält. Dazu wurde als erstes im Gaskreislauf des Anzuchtapparates direkt untersucht, ob die wachsenden Kulturen O_2 in den Gasstrom abgeben. Als Reagenz diente eine alkalische Lösung von Na-Dithionit mit einem Zusatz von Antrachinon-2-Sulfonsäure (WHITTINGHAM 1956). Der Zusatz fungiert als Katalysator der Reaktion mit O_2 , gleichzeitig läßt er durch Entfärbung die Erschöpfung der Absorptionskapazität im Reagenz erkennen. Die Zeit bis zur Entfärbung ist umgekehrt proportional dem O_2 -Gehalt des durchströmenden Gases. Zur Messung wurden zwei Kulturröhren mit am Boden eingesetzter Fritte verwendet. In diesen Röhren wurde Wasser durch Begasen mit N_2 weitgehend von O_2 befreit und anschließend das Reagenz hinzugegeben. Die eine Frittenröhre mit dem Reagenz wurde in den Gaskreislauf vor der zu untersuchenden Sterilröhre eingeschleust, die andere in den Gasstrom dahinter. Enthielt die geprüfte Kulturröhre nur Nährlösung ohne Algen, so entfärbte sich das Reagenz in beiden Frittenröhren gleichzeitig. Passierte der Gasstrom dagegen eine unter Entzug von O_2 und CO_2 wachsende Kultur, so entfärbte sich das Reagenz hinter der Algensuspension erheblich früher als vor ihr (Tab.IV).

Tabelle IV: Nachweis der Sauerstoffproduktion von glukoseernährter *Chlorella vulgaris* beim Wachstum unter O_2 -freier Begasung. Nitratnährlösung; 5000 Lux; weitere Erläuterungen im Text. Die Zahlen geben in Stunden die Zeit bis zur Entfärbung der Reagenz an.

	R ö h r e vor	m i t R e a g e n z hinter der geprüften Röhre
ohne Algen	1,75	1,75
	3,6	3,6
mit Algen	3,75	1,25
	3,75	1,66
	2,75	1,25
	3,6	2,3
	3,3	1,7
	2,5	1,25

Damit ist gezeigt, daß hinter den Kulturen der Gasstrom von den Algen produzierten O_2 enthält. Die O_2 -Menge läßt sich auf diese Weise nicht bestimmen, da die Stöchiometrie der Reaktion von O_2 mit dem Reagenz unter unseren Bedingungen nicht bekannt ist. In diesen Versuchen entfärbt sich nach längerer Zeit auch immer das Reagenz vor der geprüften Suspension. Daran erkennen wir, daß unser Gasstrom immer noch einen gewissen Grundgehalt an O_2 aufweist. Dieser beträgt jedoch nur maximal 10 ppm, wie im Abschnitt über Material und Methoden gezeigt wurde.

Die Algen zeigen eine photosynthetische O_2 -Produktion, obwohl ihnen laufend Sauerstoff und Kohlendioxid entzogen werden. Es war daher anzunehmen, daß die Photosynthese, damit die O_2 -Versorgung der Zellen, durch die CO_2 -Zufuhr limitiert ist. Zur Nachprüfung dieser Aussage wurde untersucht, ob die Kulturen weniger empfindlich gegen O_2 -Entzug werden, wenn CO_2 zugegeben wird. 5 Vol.-% CO_2 im Gasgemisch bewirken (Abb. 10), daß selbst bei extremstem O_2 -Entzug das Wachstum der Algen im Licht nicht gehemmt werden kann. Das heißt, wenn Photosynthese möglich ist, reichen unsere Methoden, den O_2 zu entfernen, nicht aus, um den O_2 -Spiegel in der Algensuspension so weit zu senken, daß er ein Wachstum der Algen nicht mehr gestattet. Auf ganz ähnliche Weise kann unter bestimmten Bedingungen Nitrat wirken. Abbildung 13 zeigt, daß mit gleicher Algenmenge beimpfte Kulturen in Nitratnährlösung schnell anwachsen, während Ammonium-Kulturen sehr langsames Wachstum aufweisen. Ähnlich wie Nitratkulturen verhalten sich hier nicht dargestellte Nitritkulturen. Dieser Nitrat- und Nitrit-Effekt läßt sich so erklären, daß die Algen die beiden Stoffe mit Hilfe des Lichtes photosynthetisch reduzieren, wobei nach KESSLER (1957) Sauerstoff entwickelt wird. Die Algen können demnach unter unseren speziellen Bedingungen mit Hilfe der Licht-Nitratreduktion nicht nur ihre Versorgung mit reduzierten Stickstoffverbindungen sicherstellen, sondern auch den gleichzeitig freiwerdenden O_2 als einen wichtigen Wachstumsfaktor verwerten,

dessen Bildung nicht durch den CO_2 -Entzug mit der Begasung unterbunden wird. Nach KESSLER (1957) muß allerdings CO_2 in katalytischen Mengen vorhanden sein, damit eine optimale Nitratreduktion ablaufen kann (siehe auch WARBURG, KRIPPAHL und JETSCHMANN 1965). Unsere glukose-ernährten Algenkulturen haben offensichtlich trotz der CO_2 -freien Begasung immer noch einen CO_2 -Gehalt im Medium, der diesen im Vergleich zum CO_2 -Verbrauch der Photosynthese geringen Bedarf decken kann.

Ein weiterer Beweis dafür, daß die photosynthetische O_2 -Produktion das Wachstum der Algen bei O_2 -Entzug unterhält, ist die Auswirkung einer Photosynthesehemmung unter diesen Bedingungen. Nach BERGMANN (1955) zeigen mixotrophe Kulturen unter O_2 -Entzug eine starke Wachstumshemmung, wenn Mangan in der Nährlösung fehlt. Wie im ersten Teil dieser Arbeit aufgezeigt wird, erzielt DCMU eine spezifischere und vollständigere Ausschaltung der photosynthetischen O_2 -Entwicklung als Manganentzug; daher wird hier nur die Auswirkung von DCMU dargestellt (Abb. 10 und Abb. 11). Während in aeroben Kulturen DCMU das Wachstum von mixotroph gezogener *Chlorella vulgaris* nur in einem bestimmten Ausmaß beeinträchtigt (Abb. 3), sind bei Sauerstoff-freier Begasung gehaltene Kulturen vollständig gehemmt. Die Hemmung ist auch wirksam, wenn im Licht CO_2 zugegeben wird (Abb. 10). In Gegenwart von DCMU verhindert also der O_2 -Entzug das Wachstum im Licht genauso wie im Dunkeln.

Zusammenfassend stellen wir fest, daß die Wachstumshemmung bei O_2 -Entzug in Glukosekulturen von *Chlorella vulgaris* nur dann durch Belichtung aufgehoben wird, wenn die Algen in der Lage sind, photosynthetisch O_2 zu produzieren. Dabei darf gleichzeitig die Entfernung von O_2 aus der Suspension durch die Begasung nicht zu schnell vor sich gehen. Da somit die Glukoseverwertung im Licht als O_2 -abhängig erwiesen ist, wird die Annahme eines besonderen Verarbeitungsweges im Licht bisher weder durch die Ergebnisse an aerob gezogenen Kulturen, noch durch die

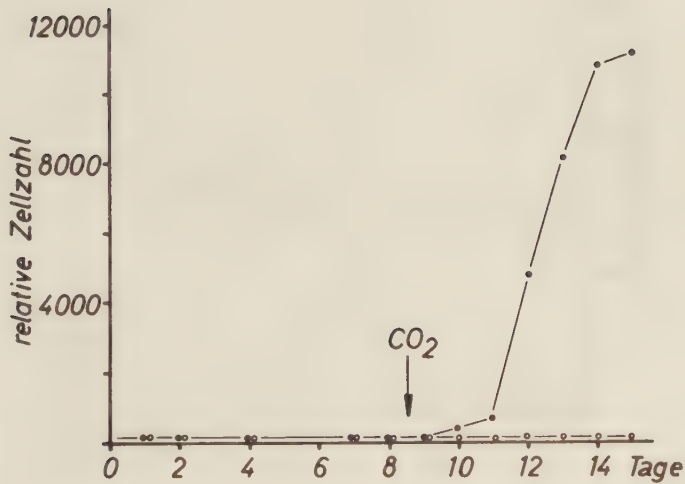


Abb. 10

Glukosekulturen von *Chlorella vulgaris* bei Entzug von O_2 und CO_2 . Starke Begasung (50 l/h), Zugabe von 5 Vol.-% CO_2 zum Gasstrom nach dem 8. Versuchstag, Nitratnährlösung, 5000 Lux, 10 ppm O_2 im Gasstrom.

- — ● Normalansatz
○ — ○ Ansatz mit DCMU

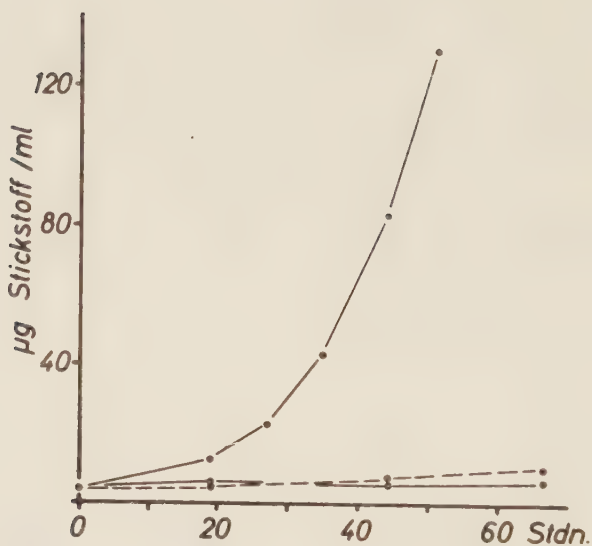


Abb. 11

Glukosekulturen von *Chlorella vulgaris* bei Entzug von O_2 und CO_2 . Auswirkung verschiedener Begasungsgeschwindigkeit. Nitratnährlösung, 5000 Lux, 10 ppm O_2 im Gasstrom.

- ——— ● Normalansatz) 5 l/h
- ——— ○ Ansatz mit DCMU)
- ——— ● Normalansatz : 50 l/h

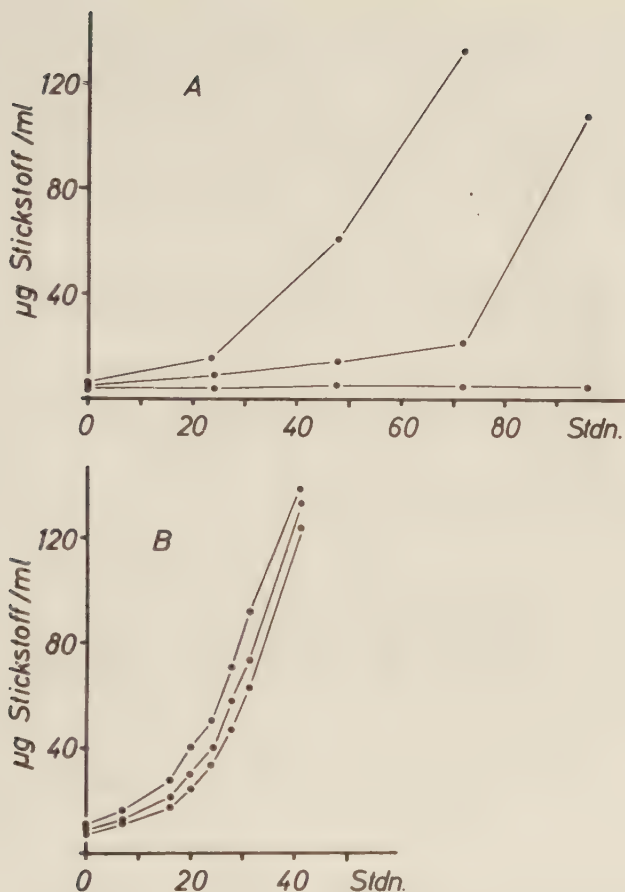


Abb. 12

Glukosekulturen von *Chlorella vulgaris* bei verschiedener Algenkonzentration unter Entzug von O_2 und CO_2 (A) und in aerober Kultur (B). Die Einimpfdichten sind in beiden Ansätzen etwa gleich und verhalten sich jeweils wie 1,6 : 1,3 : 1.

Nitratnährlösung, 11000 Lux, 10 ppm O_2 im Gasstrom (25 l/h).

A: Begasung ohne O_2 und CO_2 ; B: aerobe Begasung.

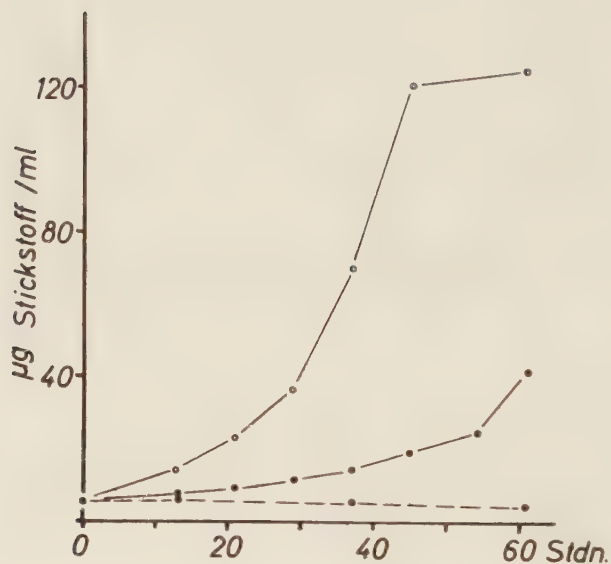


Abb.13

Glukosekulturen von *Chlorella vulgaris* bei Entzug von O_2 und CO_2 in Nitrat- und Ammonium-Nährlösung. 5000 Lux, 10 ppm O_2 im Gasstrom (25 l/h).

- — — — ● Nitratnährlösung Dunkelkontrolle
- — — — ○ Nitratnährlösung Licht
- — — — ● Ammoniumnährlösung Licht

Befunde an Sauerstoff-frei begasten Algen gestützt. Es läßt sich noch nicht entscheiden, ob der O_2 -Bedarf im Licht und im Dunkeln verschieden ist. Im nächsten Abschnitt wird diese Frage geklärt. Dazu wird im Licht und im Dunkeln die Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von der Sauerstoffkonzentration der Begasung untersucht.

2.) Die Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von *Chlorella vulgaris* von der Sauerstoffkonzentration:

Im folgenden Abschnitt muß ein Maß für die Wachstumsgeschwindigkeit der Kulturen eingeführt werden. Wir wählen dazu die Zunahmerate des Gesamtstickstoffgehaltes, angegeben als Zuwachs pro 24 Stunden in logarithmischen Einheiten (Ableitung bei WHALEY 1961; siehe auch HOOGENHOUT and AMESZ 1965). Bei der eingestellten Begasungsgeschwindigkeit von 20-25 l/h und der relativ hohen Impfdichte von 6-7 μ g Gesamtstickstoff pro Milliliter, die eine Ausbildung der sogenannten lag phase verhindern sollte, beginnt die zur Messung der Wachstumsrate geeignete exponentielle Phase des Wachstums kurz nach dem Einimpfen. Mit zunehmender Algendichte wird rasch der Lichtgenuß der Kulturen begrenzender Faktor für das Wachstum. Ebenso wirkt die geringe O_2 -Nachlieferung bei Kulturen mit niedrigem O_2 -Gehalt im Dunkeln und im Licht mit DCMU. Meist ist nach etwa einem Tag der Zustand erreicht, in dem die exponentielle Wachstumsphase beendet ist. In nicht gehemmten belichteten Kulturen geht das anfänglich mit der O_2 -Konzentration korrelierte Wachstum nach Erreichen einer bestimmten Algendichte in eine Phase mit erheblich höherer Wachstumsrate über (Abb.14 B; siehe auch 12 A). Offensichtlich geht dies darauf zurück, daß mit zunehmender Algendichte die O_2 -Produktion in den Kulturen immer größer wird. So kann die eingestellte Begasung schließlich nicht mehr den O_2 -Gehalt in der Algensuspension konstant halten.

Die angeführten Beispiele unterstreichen, daß als Maß für die vom O_2 -Gehalt der Begasung abhängige Wachstumsgeschwindigkeit nur der Zuwachs im Anfangsteil der Wachstumskurven geeignet ist.

Bei entsprechend kurzen Meßabständen ließ sich in unseren Kulturen immer eine exponentielle Wachstumsphase feststellen. Abbildung 14 zeigt einige Beispiele von Wachstumskurven in logarithmischer Darstellung: (A) für Kultur in Nitrat-, (B) für Kultur in Ammonium-Nährlösung. Die Dunkelkontrolle (C) zeigt langsam absinkende Werte vom Einimpfen an. Eine belichtete DCMU-Kultur wird für den O_2 -Gehalt von 0,05 Vol.-% dargestellt (D), weil ein niedrigerer O_2 -Gehalt kein Wachstum erlaubt. Immer (außer im Dunkeln) liegen die ersten Meßpunkte auf einer Geraden, somit verläuft das Wachstum logarithmisch.

Abb. 15 stellt die Abhängigkeit der Wachstumsraten von der O_2 -Konzentration der Begasung dar. In belichteten Nitratkulturen wird unter unseren Versuchsbedingungen die O_2 -Versorgung nicht zum begrenzenden Faktor für das Wachstum. Die Algendichte ist also schon zu Anfang so hoch, daß eine Phase, in der die Wachstumsrate vom O_2 -Gehalt der Begasung bestimmt wird, nicht auftritt (siehe auch Abb. 12 A). Dunkelkulturen weisen eine ausgesprochene Abhängigkeit auf; erst zwischen 1-3 Vol.-% O_2 werden maximale Wachstumsraten erzielt. In belichteten DCMU-Kulturen erfolgt der Anstieg im gleichen Konzentrationsbereich wie bei Dunkelkulturen; obwohl keine photosynthetische Substanzproduktion möglich ist, liegen jedoch die maximalen Wachstumsraten im Licht höher als im Dunkeln. Die Kurve der (nicht photosynthese-gehemmten) Ammoniumkulturen zeigt nun, daß auch bei intaktem Photosyntheseapparat die maximalen Wachstumsraten erst bei über 1 Vol.-% O_2 erreicht werden. Der Unterschied zu den im Dunkeln und den im Licht mit DCMU gehaltenen Kulturen besteht in der Form der Kurve beim Anstieg der Wachstumsraten und darin, daß die Maximalwerte in den belichteten Normalkulturen höher liegen.

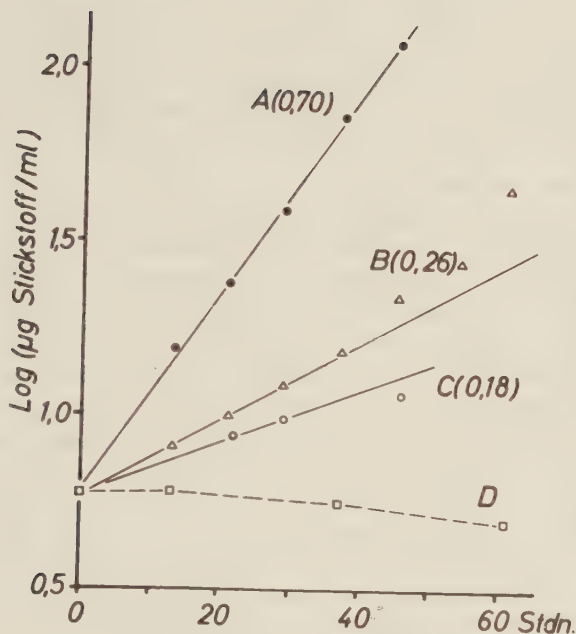


Abb. 14

Belichtete Glukosekultur von *Chlorella vulgaris* bei Begasung mit niedrigem O_2 -Gehalt. Wachstumskurven (Gesamtstickstoff) in logarithmischer Darstellung. Die Zahlen geben die Wachstumsrate ($\Delta \log N/24 \text{ h}$) für den exponentiellen Anfangsteil der Kurven an. 5000 Lux; A,B,D; bei 0,001 Vol.-% O_2 ; C: bei 0,05 Vol.-% O_2 ; A,C,D: Nitratnährlösung; B: Ammoniumnährlösung. A: Normalkultur; B: Normalkultur; C: Kultur mit DCMU; D: Dunkelkontrolle

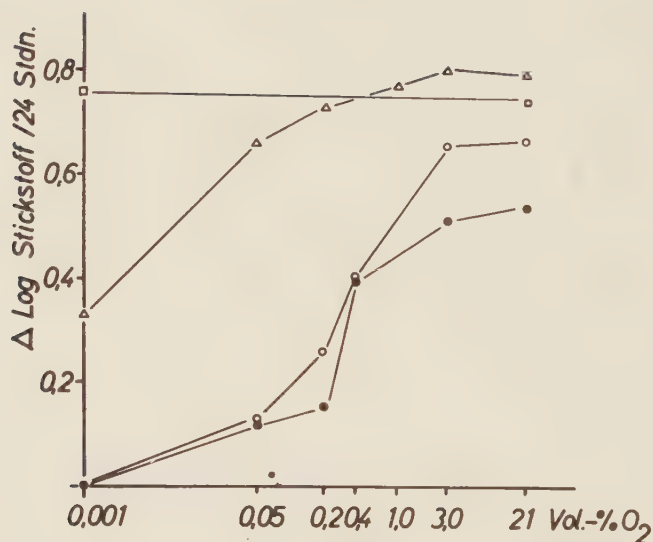


Abb. 15

Glukosekultur von *Chlorella vulgaris*. Wachstumsrate ($\Delta \log N/24h$) in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration. 5000 Lux.

- | | | | | |
|-----------|---|-----------|------------------------|--------------------|
| $\square$ | — | $\square$ | Normalkultur, Licht |) Nitratnährlösung |
| $\bullet$ | — | $\bullet$ | Normalkultur, Dunkel | |
| $\circ$ | — | $\circ$ | Kultur mit DCMU, Licht |) Nitratnährlösung |
| Δ | — | Δ | Normalkultur, Licht | |

Im vorigen Kapitel wurde gezeigt, daß auch im Licht die Wachstumsvorgänge sauerstoffabhängig sind, und daß die Sauerstoffversorgung im Licht von der Photosynthese übernommen werden kann. Mit dem jetzt gewonnenen Ergebnis ist bewiesen, daß der O_2 -Bedarf im Licht und im Dunkeln gleich hoch und bei 1-3 Vol.-% O_2 voll gedeckt ist. Eine lichtspezifische Glukoseassimilation, welche die Rolle der oxydativen Glukoseassimilation beim Wachstum übernehmen kann, ist also nicht nachzuweisen.

Aus Abb. 15 ergibt sich eine leichte Erhöhung der Wachstumsraten in belichteten DCMU-Kulturen gegenüber Dunkelkulturen. Die Erhöhung ist relativ gering, sie ist aber durch zahlreiche Meßwerte gesichert. Da die photosynthetische CO_2 -Fixierung durch das Gift unterbunden wird, ist in dieser Erhöhung der Wachstumsraten der Nachweis einer erhöhten Proteinsynthese mit Hilfe einer lichtabhängigen Glukoseverarbeitung zu sehen. Während im ersten Teil dieser Arbeit bei der Darstellung der belichteten DCMU-Kulturen nur festgestellt wurde, daß DCMU die Proteinsynthese so weit einschränkt, daß die Werte von Lichtkulturen denen von Dunkelkulturen nahe kommen, sei jetzt auf die damals schon beachtete Förderung der Proteinsynthese durch Licht näher eingegangen. Dabei braucht uns nicht zu stören, daß im weißen Licht die DCMU-gehemmten Kulturen einen niedrigen Kohlenhydratspiegel aufweisen, denn es wurde gezeigt, daß unabhängig von der durch die Lichtqualität hervorgerufenen Verschiebung des Kohlenhydratspiegels die Proteinsynthese in DCMU-Kulturen durch Blau- und durch Rotlicht leicht gegenüber Dunkel gefördert ist. Zunächst untersuchen wir im folgenden Abschnitt, ob sich auch in Kulturen ohne DCMU eine Erhöhung der Proteinproduktion durch einen lichtabhängigen Prozess der Glukoseassimilation nachweisen läßt. Dazu werden die Wachstumsraten gut mit CO_2 versorgter aerober und CO_2 -begrenzter, Sauerstoff-frei begaster Kulturen in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke gemessen.

3.) Die Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit bei *Chlorella vulgaris* von der Beleuchtungsstärke:

Der Vergleich der in Abbildung 16 dargestellten Kurven ergibt, daß bei Begasung ohne O_2 und CO_2 die Wachstumsraten zunächst mit der Erhöhung der Beleuchtungsstärke sehr rasch ansteigen, so daß bei etwa 2000 Lux die Sauerstoff-frei begasten Algen ebenso schnell wie in Kulturen mit Luft und CO_2 wachsen. Die beiden Kurven steigen gemeinsam weiter bis zu einer Beleuchtungsstärke von 5000 Lux. Darüber hinaus erhöhte Beleuchtungsstärken führen in O_2 -frei begasten Kulturen zu keinem weiteren Anstieg des Wachstums, vielmehr tritt bei 11000 Lux sogar eine Lichthemmung auf. Bei dieser Beleuchtungsstärke haben dagegen aerobe Kulturen immer noch nicht ihre maximalen Wachstumsraten erreicht.

Zur Deutung dieses Ergebnisses nehmen wir an, daß in O_2 -frei begasten Kulturen die CO_2 -Produktion der respiratorischen Abbauprozesse der begrenzende Faktor für die Photosynthese ist. Eine Verstärkung der Beleuchtung erhöht zunächst den CO_2 -Umsatz des Photosyntheseapparates, so daß, obwohl die Begasung CO_2 -frei ist, mit steigender Beleuchtungsstärke ein immer größerer Anteil des zur Verfügung stehenden CO_2 vom Photosyntheseapparat genützt wird. Bei etwa 5000 Lux scheint das von der Atmung angelieferte CO_2 vollständig verwertet zu werden, da bei höherer Beleuchtungsstärke die Wachstumsrate nicht mehr gesteigert wird. Wichtig ist für uns der Befund, daß die Zelle bei begrenzter photosynthetischer CO_2 -Fixierung den Mangel an Substanzproduktion nicht mit Hilfe einer lichtabhängigen Verarbeitung exogener Glukose aufheben kann. Die Erhöhung der Wachstumsrate mit steigender Beleuchtungsstärke geht also auch in Glukosekulturen im wesentlichen auf die photosynthetische Substanzproduktion mit Hilfe der CO_2 -Reduktion zurück.

Aus dem hier dargestellten Ergebnis läßt sich kein Hinweis auf eine Wachstumssteigerung durch Licht, die von der photosynthetischen CO_2 -Reduktion unabhängig verläuft, entnehmen. Das bedeutet nicht, daß eine solche Lichtwirkung

nicht vorhanden ist, denn wir haben in den weiter oben dargestellten DCMU-Kulturen (Abb. 15) eine deutliche Wachstumsförderung durch Licht von 5000 Lux gegenüber Dunkel festgestellt. In Abbildung 16 ist nun zu erkennen, daß oberhalb von 5000 Lux die Wachstumsraten nicht gesteigert werden können. Danach ist zu schließen, daß der einzige Fall einer Wachstumsförderung durch Licht, den wir als unabhängig von der photosynthetischen CO_2 -Fixierung nachweisen können, auf einen Prozeß zurückgehen muß, der schon unterhalb von 5000 Lux gesättigt ist. Es liegt nahe, in dieser lichtabhängigen Wachstumsförderung eine Wirkung der zyklischen Photophosphorylierung zu sehen. Wir kennen diese als einen Prozeß, der durch DCMU wenig beeinträchtigt wird und schon bei etwa 1200 Lux Lichtsättigung erreicht (TANNER und Mitarb. 1965).

4.) Vergleich zwischen Chlorella vulgaris und Chlorella pyrenoidosa:

Während Glukosekulturen von Chlorella vulgaris unter weiter oben im einzelnen beschriebenen Bedingungen in O_2 -frei begastem Medium im Licht ein gutes Wachstum zeigt, wächst Chlorella pyrenoidosa unter den gleichen Bedingungen nicht. Um dieses Phänomen zu erklären, wird im folgenden ausführlicher dargestellt, wie man sich die Dynamik des Gasumsatzes unter diesen für die Algen extremen Bedingungen vorzustellen hat. Dabei wird von einer Betrachtung der Verhältnisse bei Chlorella vulgaris ausgegangen.

Wir wissen einerseits von Chlorella vulgaris, daß das Wachstum in Glukosekultur im Licht von O_2 abhängig ist. In O_2 - und CO_2 -frei begastem Medium können jedoch die Algen für ein optimales Wachstum ausreichende O_2 -Mengen photosynthetisch selbst produzieren. Die Photosynthese andererseits ist bei O_2 - und CO_2 -freier Begasung CO_2 -begrenzt. Die Algen haben nur soviel CO_2 zur Verfügung, wie die Atmung produzieren kann. So muß sich bei O_2 - und CO_2 -freier Begasung in den Algen ein Kreisprozeß einspielen, in dem die Photosynthese die Atmung mit O_2 und die At-

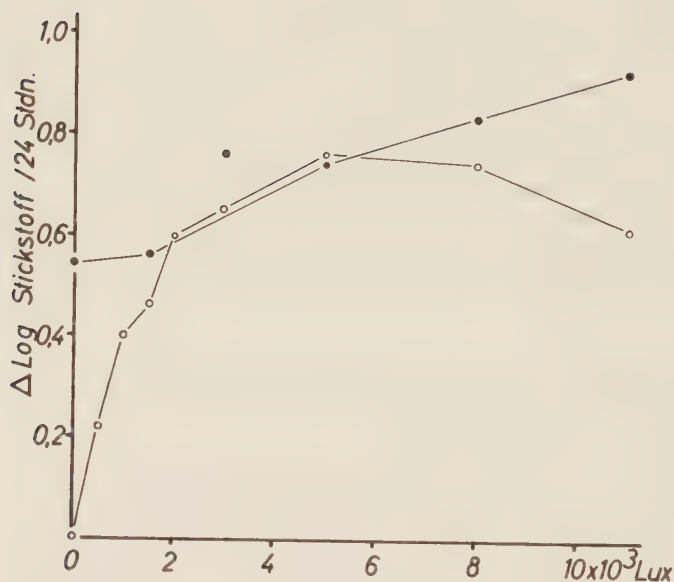


Abb. 16

Glukosekultur von *Chlorella vulgaris*.

Wachstumsraten ($\Delta \log N / 24 \text{ h}$) in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke. Mittelwerte aus 3-10 Parallelversuchen; ein besonders abweichender Mittelwert wurde nicht in die Kurve einbezogen. Nitratnährlösung.

- — ● Normalkultur in Luft + CO_2
- — ○ Normalkultur bei O_2 - und CO_2 -freier Begasung.

mung die Photosynthese mit CO_2 beliefert. Den Beginn des beschriebenen Kreisprozesses muß man sich so vorstellen, daß bei dem minimalen O_2 -Gehalt der Begasung doch eine, wenn auch sehr kleine Restatmung vorliegen kann; zudem dürfte die Gärung auch eine geringe CO_2 -Menge liefern. Der Photosyntheseapparat kann außerdem auch in völliger Anaerobiose bei Belichtung sofort eine geringe O_2 -Menge produzieren (SPRUIT 1962). Sobald geringe Mengen der gebrauchten Gase zur Verfügung stehen, ist eine weitere Verbesserung der Gasversorgung aufgrund der von 1 abweichenden Gaswechselquotienten vorstellbar (siehe unten). In der verwendeten Versuchsanordnung ist noch ein Faktor sehr wichtig, den wir bisher außer acht gelassen haben. Der durch die Begasung perpendende Gasstrom entfernt nämlich laufend O_2 und CO_2 aus dem System, wie in einem früheren Abschnitt für den Sauerstoff nachgewiesen wurde (Tabelle IV). Da die Algen trotz dieser Auswaschung ein für die eingestellte Beleuchtungsstärke optimales Wachstum zeigen können, ist zu folgern, daß das System der gegenseitigen Versorgung von Atmung und Photosynthese einen Überschuß an O_2 produziert. NEISH (1951) zeigte dies direkt. In einem anaerob angesetzten Kulturgefäß war O_2 nachzuweisen, nachdem darin Algen mit Glukose im Licht gewachsen waren. Der Überschuß resultiert nach unserer Deutung daher, daß beim Wachstum in Glukosemedium der Gaswechselquotient der Atmung (RQ) über und der Photosynthese (PQ) unter 1 liegt. Das heißt, die Atmung produziert mehr CO_2 und die Photosynthese mehr O_2 , als O_2 bzw. CO_2 in dem jeweiligen Prozeß aufgenommen wird. Diese Deutung stützt sich auf die Erfahrung, daß eine Erniedrigung des RQ bzw. eine Erhöhung des PQ die Algen gegen O_2 -Entzug empfindlicher macht; Ammoniumkulturen wachsen bei O_2 -freier Begasung erheblich schlechter als Nitratkulturen (Abb.13). Bei manometrischen Messungen betrug in aerob wachsenden Glukosekulturen der RQ z.B. bei Ammoniumernährung -1,19, bei Nitraternährung -1,54 (Literaturübersicht bei SYRETT 1962).

Wir haben die für das Wachstum unter O_2 -freier Begasung wichtigen Faktoren charakterisiert. Die Entscheidung, ob ein Wachstum zustande kommt oder nicht, wird durch die Konkurrenz um den O_2 zwischen dem Gasstrom und der Atmung bestimmt. Die eine Voraussetzung dafür, daß ein Wachstum beginnen kann, obwohl die Begasung O_2 wegführt, ist die Überproduktion an O_2 , die für eine Gasauswaschung einen gewissen Spielraum schafft. Die zweite Voraussetzung ist eine gewisse Konkurrenzkraft der Atmung, d.h. die Atmung muß den gebildeten O_2 genügend schnell umsetzen können, bevor dieser von der Begasung abtransportiert wird.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde schon der Unterschied in der Geschwindigkeit des heterotrophen Dunkelwachstums zwischen *Chlorella vulgaris* ($k_{24} = 0,54$) und *Chlorella pyrenoidosa* ($k_{24} = 0,41$) herausgestellt. Die geringere Tendenz zur Heterotrophie drückt sich bei *Chlorella pyrenoidosa* auch in einem gegenüber *Chlorella vulgaris* herabgesetzten Gaswechsel der Glukoseatmung aus (WIESSNER mündliche Mitteilung). Unter O_2 -freier Begasung von festgelegter Geschwindigkeit wird also *Chlorella pyrenoidosa* gegenüber *Chlorella vulgaris* im Nachteil sein; der Gasstrom führt immer einen höheren Anteil des gebildeten O_2 weg. Der Unterschied im Gasumsatz der beiden Algen wirkt sich bei der eingestellten Begasungsgeschwindigkeit offensichtlich so stark aus, daß *Chlorella vulgaris* eine O_2 -Konzentration aufrechterhalten kann, die eine volle oxydative Assimilation gestattet, während bei *Chlorella pyrenoidosa* eine zum Wachstum ausreichende O_2 -Menge nicht mehr zur Verfügung steht.

IV. Diskussion:

Ausgangspunkt der Arbeit war die Frage, ob in *Chlorella* eine lichtspezifische Glukoseassimilation möglich ist, die dem Typ der photoheterotrophen Assimilation bei manchen photosynthetischen Bakterien entspricht. Unter Photoheterotrophie verstehen wir die Verwendung von Lichtenergie zur Assimilation von organischem Substrat. Es ließ sich klar zeigen, daß bisher von *Chlorella* bekannte Phänomene (BERGMANN 1955), die in eine solche Richtung zu deuten schienen, nicht mit einer Photoheterotrophie in Zusammenhang stehen. Eine echte Photoheterotrophie kennt man nur bei photosynthetischen Bakterien und bei den Acetatflagellaten *Chlamydothrix* und *Chlamydomonas mundana*. In *Chlorella* ist zwar auch eine lichtabhängige Wachstumsförderung in Glukosekulturen nachzuweisen, diese geht aber zum wesentlichen Teil auf die photosynthetische CO_2 -Reduktion zurück. Der photoheterotrophen Acetat-Assimilation von *Chlamydothrix* entspricht in Glukosekultur von *Chlorella* nur die relativ geringe lichtabhängige Wachstumsförderung, die in DCMU-Kulturen nachzuweisen ist. Wie in *Chlamydothrix*, wo die lichtabhängige Acetat-Assimilation als von der zyklischen Photophosphorylierung abhängig erwiesen ist, (WIESSNER 1965), scheint auch die von der photosynthetischen CO_2 -Reduktion unabhängige Wachstumsförderung durch Licht in *Chlorella* durch die Energielieferung des gleichen Prozesses unterhalten zu werden. Dies ist aus der Unempfindlichkeit der Wachstumsförderung gegenüber DCMU zu erschließen, sowie daraus, daß schon unterhalb von 5000 Lux eine Lichtsättigung auftritt. Der Sättigungswert liegt damit ähnlich niedrig wie bei der Glukoseaufnahme mit Hilfe der zyklischen Photophosphorylierung (TANNER und Mitarb. 1965). Unter unseren Bedingungen scheint die zusätzliche Energielieferung die Proteinsynthese zu stimulieren. Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, daß auch eine Lichtaktivierung zur Proteinsynthese notwendiger Enzyme bei dieser Wachstumsförderung durch Licht im Spiele sein könnte (BERGER 1964).

An den bisher angeführten Organismen läßt sich die große Variabilität in der Rolle der beiden Komponenten einer lichtabhängigen Wachstumsförderung gut demonstrieren: In *Chlorella* ist die photosynthetische CO_2 -Reduktion der wesentliche wachstumsfördernde Prozeß, neben dem besonders bei hohen Beleuchtungsstärken die Förderung durch die zyklische Photophosphorylierung unwichtig erscheint. Bei *Chlamydomonas* sind die Verhältnisse genau umgekehrt. Mit Hilfe der photosynthetischen CO_2 -Reduktion allein kann hier nur noch sehr langsames Wachstum erfolgen (WIESSNER 1962 b). In *Rhodospirillum* schließlich ist die CO_2 -Reduktion nur noch eine für die selbständige Substanzproduktion gänzlich ungeeignete Hilfsreaktion bei der photoheterotrophen Assimilation von organischem Substrat.

Obwohl zwischen dem rein photoheterotrophen Organismus *Chlamydomonas*, bei dem der gesamte Stoffwechsel mit Hilfe der Lichtenergie betrieben werden muß - im Dunkeln erfolgt kein Wachstum -, und *Chlorella*, bei der die photoheterotrophe Glukoseverarbeitung von quantitativ geringer Bedeutung ist, beträchtliche Unterschiede bestehen, zeigen beide eine grundsätzliche Gemeinsamkeit gegenüber dem rein photoheterotrophen *Rhodospirillum*. Sowohl *Chlorella* als auch *Chlamydomonas* (WIESSNER und GAFFRON 1964) benötigen beim lichtabhängigen Wachstum unter anaeroben Außenbedingungen zusätzlich zu der Energielieferung durch Licht die photosynthetische Produktion von O_2 . Ohne O_2 kann die Photoassimilation nicht durchgeführt werden. Während *Rhodospirillum* im Licht einen echten anaeroben Stoffwechsel unterhält, benötigen die Algen immer eine, wenn auch verdeckte, aerobe Stoffwechselkomponente. Es schließt sich dabei nicht aus, daß beide Gruppen in einer groben äußerlichen Analogie an die Umgebung vollständig gleiche Ansprüche stellen; beide benötigen von außen nur Licht und ein organisches Substrat.

An *Chlorella vulgaris* wurde der O_2 -Bedarf für das Wachstum mit Glukose im Licht ermittelt. Erst bei einer Konzentration zwischen 1 und 3 Vol.-% O_2 im durchperlenden

Gas erfolgt maximales Wachstum. Der gleiche Wert gilt auch für Dunkelkulturen. Unser Meßwert steht in Einklang mit der Angabe von KANDLER (1954), daß die Glukoseatmung von *Chlorella* bei etwa 3 Vol.-% Sauerstoff gesättigt ist. Für die optimale Lichtassimilation von Acetat durch *Chlamydomonas* beträgt nach WIESSNER und GAFFRON (1964) der O_2 -Bedarf nur 0,5 Vol.-%. Da diese Alge eine geringere Atmungskapazität als *Chlorella* besitzt, ist anzunehmen, daß die benötigte Konzentration auch hier die Atmung voll sättigt. In beiden Algen ist also für eine optimale Assimilation des Substrates im Licht gleichzeitig die volle Atmung, wie sie im Dunkeln vorliegt, notwendig. Die von WIESSNER und GAFFRON (1964) gegebene Erklärung für die Notwendigkeit von Sauerstoff für oxydative Schritte in der Assimilation dürfte auch auf *Chlorella* zu übertragen sein. Danach liefert zwar die Lichtphosphorylierung zum Wachstum ausreichende Energiemengen, die Assimilation des Substrates im Licht kann aber nicht ohne gleichzeitige Atmung erfolgen, weil sonst das anfallende reduzierte NAD nicht reoxydiert werden kann. In grünen Pflanzen ist im Gegensatz zu *Rhodospirillum* die CO_2 -Reduktion spezifisch an die Verwendung von $NADPH_2$ gebunden. Ein System, das Wasserstoff von $NADH_2$ auf NADP überträgt, ist hier offensichtlich nicht aktiv; so muß ohne Atmung die Assimilation des organischen Substrates zum Stillstand kommen, weil kein H-Akzeptor zur Verfügung steht. In *Rhodospirillum* besteht dieses Problem nicht, weil hier $NADH_2$ direkt zur CO_2 -Reduktion verwendet werden kann. Wenn man von spezifisch O_2 -abhängigen Synthesen (BLOCH 1962) absieht, ist also der Grund für den O_2 -Bedarf der Algen darin zu sehen, daß der als Stoffwechsel-Endprodukt aus dem Substrat stammende Wasserstoff nicht wie bei den Bakterien auch außerhalb der Atmungskette beseitigt werden kann. In der Verwendung des einen Pyridinsystems in Substratabbau und Photosynthese bei den Bakterien mag eine Korrelation der einfacheren morphologischen Struktur mit einer in dieser Hinsicht auch weniger komplizierten biochemischen Organisation gesehen werden.

Während bisher nur auf die wachstumsfördernde Wirkung der üblichen Beleuchtung mit Weißlicht eingegangen wurde, haben wir nun zu beachten, daß die Wirkung der Beleuchtung auf die Algen in starkem Maße von der Lichtqualität abhängig ist. KOWALLIK (1962) stellte zum erstenmal an autotrophen Algen die durch blaues Licht hervorgerufenen Verschiebungen in der Zellzusammensetzung heraus. Im folgenden soll die Wirkung des blauen Lichtes auf unsere Glukosekulturen von *Chlorella* näher diskutiert werden. Wir setzen voraus, daß der beobachtete Blau-effekt in autotroph und mixotroph gezogenen Algen auf den gleichen Wirkungsmechanismus zurückgeht und nur einen Angriffspunkt in den Zellen besitzt.

In der von KOWALLIK (1962) untersuchten autotrophen *Chlorella pyrenoidosa* ist bei Kultur im Blaulicht der Proteingehalt gegenüber Rot um etwa 20% erhöht. Der Kohlenhydrat-Gehalt wird dabei um den gleichen Betrag erniedrigt; beide Kulturen zeigen gleiche Trockengewichtsproduktion. In unseren mixotrophen Kulturen der gleichen Alge beträgt die Erhöhung des Proteingehaltes im Blau auch etwa 20%, dagegen ist der Kohlenhydrat-Gehalt der Blaukulturen gegenüber Rot erheblich stärker erniedrigt. Hier entsprechen sich also nicht mehr die Vermehrung des Proteins und die Verringerung der Kohlenhydrate. In mixotroph gezogener *Chlorella vulgaris* ist andererseits der Proteingehalt durch Blau nur sehr geringfügig erhöht, der Kohlenhydrat-Gehalt ist aber auch hier stark erniedrigt. Auch in N-freiem Medium, also ohne eine Proteinsynthese, ist der Kohlenhydrat-Spiegel durch Blau erniedrigt.

Photosynthese-gehemmte Ansätze (DCMU) schließlich zeigen extrem erniedrigte Kohlenhydrat-Werte im Blau, dabei ist in diesem Falle die Proteinsynthese im Blau gegenüber Rot sogar im Nachteil. Während also in autotrophen Kulturen der Eindruck entstehen konnte, daß im Blaulicht die Verschiebung in der Zellzusammensetzung durch Stimulierung des Umbaus von Kohlenhydrat in Protein zustande

kommt, zeigen die mixotroph ernährten Kulturen, daß die Förderung der Proteinsynthese nicht die primäre Ursache für die Senkung des Kohlenhydrat-Spiegels sein kann. In autotroph und mixotroph gezogenen Algen scheint vielmehr das Blaulicht zunächst den Kohlenhydrat-Spiegel zu erniedrigen.

Kennzeichnend für den physiologischen Zustand der Blaulichtzellen in mixotropher Kultur ist also ein stark erniedrigter Kohlenhydrat-Spiegel und ein maximal hoher Protein-Spiegel. Als drittes, wichtiges Merkmal kommt eine verringerte Aufnahme von Glukose aus dem Medium hinzu.

Man kann schließen, daß im Blaulicht der Aufbau von Speicherkohlenhydrat gegenüber dem Abbau in Nachteil gerät. Die daraus resultierende Erniedrigung des Kohlenhydrat-Spiegels gilt gleichermaßen wie für mixotroph gehaltene auch für autotrophe Zellen. Mit dem niedrigen Spiegel an Kohlenhydraten in der Zelle muß zwangsläufig in mixotrophen Kulturen eine durch Blau verringerte Entnahme von Glukose aus dem Medium einhergehen. Es muß angenommen werden, daß die Pool-Größe an löslichen Kohlenhydratverbindungen (insbesondere Zuckerphosphaten) in der Zelle nicht über einen bestimmten Wert hinausgehen kann. Die Glukoseaufnahme wird nicht mit der sonst üblichen Geschwindigkeit ablaufen, solange nur die Atmung und die Proteinsynthese, nicht aber Speicherungsprozesse aus dem intrazellulären Pool von Glukosephosphaten etwas entnehmen. Die Regulierung der Poolgröße könnte z.B. schon über die Hexokinase erfolgen, für die man an tierischen Zellen eine Hemmung durch hohe Konzentrationen an Glukose-6-Phosphat nachgewiesen hat (siehe LOMBERG-HOLM 1959). Trotz der Verringerung des Kohlenhydrat-Spiegels ist die Proteinsynthese nicht beeinträchtigt. Vielmehr kann sie sogar leicht gesteigert sein, da die Konkurrenz der Speicherung erheblich vermindert ist.

Die Reaktion der Zelle auf Blaulicht läßt sich also auf die Folgen der Erniedrigung des Kohlenhydrat-spiegels zurückführen. Über den Mechanismus der Blaulichtwirkung können wir noch keine sicheren Aussagen machen. Es könnte eine direkte Aktivierung von stärkeabbauenden Enzymen vorliegen (PARIJA und SARAN 1934; vgl. auch RIED 1965 und das Schema bei FRENCH 1966; siehe auch WOLF 1964). Es wäre aber auch die Aktivierung einer lichtabhängigen ATP-ase durch Blaulicht denkbar, da man an Chloroplasten höherer Pflanzen eine solche Lichtwirkung nachgewiesen hat (PETRACK und LIPMANN 1961; PETRACK und Mitarb. 1965; BENNUM und AVRON 1964; 1965). Mit einer solchen Annahme würde auch das folgende Ergebnis von KOWALLIK und GATFRON (1966) in Einklang stehen. In Zellen aus Glukosekultur, die in Puffer ohne Glukose und Stickstoffquelle gehalten werden, nimmt im Rotlicht und im Dunkeln die Atmungsrate fortschreitend ab. Blaulicht dagegen hält unter diesen Bedingungen die Atmung auf einem konstanten Wert, der mit der vollen Glukoseatmung identisch ist. Anscheinend liegt im Blau unter diesen Spezialbedingungen eine Art von Leerlaufatmung vor, die durch Bestrahlung eines im Chloroplasten lokalisierten Carotinoides (KOWALLIK 1965, 1966) in Gang gehalten wird. Es liegt nahe, die trotz fehlendem Energiebedarf hohe Atmung mit einer blaulichtgesteuerten ATP-ase in Zusammenhang zu bringen. Eine erhöhte ATP-Spaltung im Plastiden würde den ADP-Pool auch in weiteren Bereichen der Zelle anheben, wenn nach HEBER und Mitarb. (1964) ADP und ATP leicht durch die Plastidenmembran transportiert werden. So könnte die Limitierung der Atmung, die in vielen Fällen als ADP-abhängig erwiesen wurde (Übersicht bei KREBS 1962; siehe auch HEBER und Mitarb. 1964), durch einen erhöhten ADP-Spiegel aufgehoben sein.

Bei dem dann begrenzten ATP-Angebot in der Zelle kann anscheinend durch einen noch unerklärten, im Effekt aber schon mehrfach beobachteten Regulationsvorgang

eine Rangfolge in den energieverbrauchenden Prozessen wirksam werden. Dabei erhält in den Blaulichtzellen die Proteinsynthese den Vorrang vor der Kohlenhydratspeicherung. Ein analoger Fall einer Bevorzugung der Proteinsynthese gegenüber der Speicherung tritt z.B. unter Schwachlichtbedingungen auf (vgl. RUPPEL 1962). Die Hemmung der Glukoseaufnahme dürfte sich auch in dem hier angenommenen Fall zwangsläufig daraus ergeben, daß der Pool an löslichen Zuckerphosphaten nur wenig von der Speicherung in Anspruch genommen wird.

In dem durch unsere Methoden begrenzten Rahmen muß die Deutung der Blaulichtwirkung hypothetisch bleiben. Aufgabe für die Zukunft ist die nähere biochemische Analyse der Regulationsmechanismen, deren Auswirkung hier auf physiologischer Ebene beschrieben wurde.

V. Zusammenfassung:

1.) Das Wachstum belichteter Glukosekulturen von *Chlorella vulgaris* (211/11 h) und *Chlorella pyrenoidosa* (211/8 b) wurde bei Hemmung der Photosynthese durch DCMU und Manganentzug, sowie bei gleichzeitiger Beschränkung der Sauerstoff- und Kohlendioxid-Zufuhr untersucht.

2.) Sowohl mäßiger Manganentzug als auch DCMU (10^{-5} M) hemmt das Wachstum in belichteter Glukosekultur; im Dunkeln wachsen die Algen ungehemmt. In fortgeschrittenem Manganmangelzustand kommt es zu einer zusätzlichen Beeinträchtigung des Wachstums über die Folgen der spezifischen Photosynthese-Hemmung mit DCMU hinaus. Bei Photosynthese-Hemmung ist das Wachstum der Kulturen im Licht gegenüber Dunkelkulturen leicht gefördert.

3.) Die Förderung des Wachstums durch Licht geht in Glukosekultur auf zwei verschiedene Prozesse zurück:

- a. die zur Dunkelassimilation zusätzliche photosynthetische CO_2 -Reduktion,
- b. eine von der CO_2 -Reduktion unabhängige Förderung

durch Energielieferung aus der zyklischen Photophosphorylierung. Diese hat gegenüber der CO_2 -Reduktion bei *Chlorella* nur untergeordnete Bedeutung.

4.) Die Qualität des Anzuchtlichtes beeinflusst das Wachstum nur geringfügig, in starkem Maße dagegen den Kohlenhydratgehalt der Zellen. Während im Rotlicht etwa der gleiche Kohlenhydratgehalt wie im Dunkeln erreicht wird, ist im weißen und blauen Licht der Kohlenhydrat Spiegel erniedrigt. Das niedrige Kohlenhydratniveau im Blau steht mit einer Hemmung der Glukoseentnahme aus dem Medium in Zusammenhang.

5.) Die Wachstumsrate ($\Delta \log. \text{Ges.N}/24 \text{ Stdn.}$) von Glukosekulturen erreicht im Licht und im Dunkeln bei einer Konzentration zwischen 1 und 3 Vol.-% O_2 jeweils maximale Werte.

6.) Ein Wachstum im Licht findet unter strikt anaeroben Bedingungen nicht statt. Wachstum kann einsetzen, sobald eine photosynthetische Sauerstoffproduktion ermöglicht wird. Dann ergibt sich eine gegenseitige Versorgung der Photosynthese und der Atmung mit CO_2 bzw. O_2 . Nitrat (gegenüber Ammoniumsalz) kann die Einstellung dieses Kreisprozesses beträchtlich erleichtern.

7.) Das Wachstum ist bei *Chlorella pyrenoidosa* gegen O_2 -Entzug bedeutend empfindlicher als bei *Chlorella vulgaris*; dies wird mit dem geringeren respiratorischen Gasumsatz (geringere Tendenz zur Heterotrophie) der ersteren in Zusammenhang gebracht.

8.) Es wird der Unterschied zwischen dem photoheterotrophen Stoffwechseltyp bestimmter Purpurbakterien und dem Ernährungstyp von *Chlorella* unter mixotrophen Bedingungen diskutiert.

9.) Eine mögliche Erklärung der bisher an *Chlorella* beobachteten Blaulicht-Effekte wird erörtert.

VI. Literaturverzeichnis:

- ARNON, D.I.: The chloroplast as a functional unit in photosynthesis.
In: W.RUHLAND: Handbuch der Pflanzenphysiologie, V,1, 773-829 (1960).
- ARNON, D.I., H.Y. TSUJIMOTO, and B.D.McSWAIN:
Role of ferredoxin in photosynthetic production of oxygen and phosphorylation by chloroplasts.
Proc.Natl.Acad.Sciences 51, 1274-1282 (1964).
- BADOUR, S.S.A.: Kennzeichnung von Mineralsalzmangelzuständen bei Grünalgen mit analytisch-chemischer Methodik.
II Phosphatfraktionen bei Kaliummangel im Vergleich mit Magnesium- und Manganmangel.
Flora 151, 99-119 (1961).
- BENNUM, A. and M.AVRON:
Light-dependent and light-triggered adenosine triphosphatases in chloroplasts.
Biochim.Biophys.Acta 79, 646-648 (1964).
- - : The relation of the light-dependent and light-triggered adenosine triphosphatases to photophosphorylation.
Biochim.Biophys.Acta 109, 117-127 (1965).
- BERGER, C.: Aktivitätsänderungen einiger Enzyme während der Zellentwicklung synchronisierter Chlorella-Zellen.
Dissertation Göttingen 1964.
- BERGMANN, L.: Stoffwechsel und Mineralsalzernährung einzelliger Grünalgen. II Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß mineralischer Faktoren bei heterotropher und mixotropher Ernährung.
Flora 142, 493-539 (1955).

- BISHOP, N.: The influence of the herbicide DCMU on the oxygen-evolving system of photosynthesis.
Biochim.Biophys.Acta 27, 205-206 (1958).
- : The photometabolism of glucose by an hydrogen-adapted alga.
Biochim.Biophys.Acta 51, 323-332 (1961).
- BLOCH, K. : Oxygen and biosynthetic patterns.
Federation Proceedings 21, 1058-1063 (1962).
- DAMASCHKE, K., L.ROTHBÜHR und F. TÖDT:
 Photosynthese unter anaeroben Bedingungen.
*Z.Naturf.*10 b, 572-578 (1955).
- EPPLEY, R.W., R.GEE, and P. SALTMAN:
 Photometabolism of acetate by *Chlamydomonas mundana*.
Physiologia Plantarum 16, 777-792 (1963).
- EYSTER, C., T.E.BROWN, H.A. TANNER, and S.L.HOOD:
 Manganese requirement with respect to growth, Hill-reaction and photosynthesis.
Plant Physiology 33, 235-241 (1958).
- FOGG, G.E.: Nitrogen nutrition and metabolic patterns in algae.
*Symp.Soc.Exp.Biol.*8, 106-125 (1959).
- FORTI, G. and B.PARISI:
 Evidence for the occurrence of cyclic photophosphorylation in vivo.
Biochim.Biophys. Acta 71, 1-6 (1963).
- FRENCH, C.S.: Kinetics of oxygen evolution.
 In: J.B.THOMAS and J.C. GOEDHEER:
Currents in photosynthesis, S.285-292 (1966).
- GIBBS, M.: Fermentation.
 In: R.A.LEWIN: *Physiology and biochemistry of algae*, New York and London, S.91-97, (1962).

GINGRAS, G. and C. LEMASSON:

A study of the mode of action of 3-(-4-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea on photosynthesis.
Biochim.Biophys. Acta 109, 67-78 (1965).

HARVEY, E.N. and T.F. MORRISON:

The minimum concentration of oxygen for luminescenz by luminous bacteria.
J.Gen.Physiology 6, 13-19 (1924).

HEBER, U., K.A. SANTARIUS, W. URBACH und W. ULLRICH:

Photosynthese und Phosphathaushalt.
Z.Naturf. 19 b, 576-587 (1964).

HOOGENHOUT, H. and J. AMESZ:

Growth rates of photosynthetic micro-organisms in laboratory cultures.
Arch.Mikrobiol. 50, 10-25 (1965).

KANDLER, O.: Über die Beziehungen zwischen Phosphathaushalt und Photosynthese. II Gesteigerter Glukose-einbau im Licht als Indikator einer lichtabhängigen Phosphorylierung.
Z.Naturf. 9 b, 625-644 (1954).

KESSLER, E.: Untersuchungen zum Problem der photochemischen Nitratreduktion in Grünalgen.
Planta 49, 505-523 (1957).

KOWALLIK, W.: Über die Wirkung des blauen und roten Spektralbereiches auf die Zusammensetzung und Zellteilung synchronisierter Chlorellen.
Planta 58, 337-365 (1962).

- : Die Proteinproduktion von Chlorella im Licht verschiedener Wellenlängen.
Planta 64, 191-200 (1965).

- : Einfluß verschiedener Lichtwellenlängen auf die Zusammensetzung von Chlorella in Glukosekultur bei gehemmter Photosynthese.
Planta 69, 292-295 (1966).

-, and H. GAFFRON:

Respiration induced by blue light.
Planta 69, 92-95 (1966).

- KREBS, H.A. : Control of cellular metabolism.
In: J.M.ALLEN: The molecular control of cellular activity. New York-Toronto-London, 279-296 (1962).
- KUHL, A : Zur Physiologie der Speicherung kondensierter anorganischer Phosphate in Chlorella.
In: Vorträge aus dem Gesamtgebiet der Botanik, Hrsg.: Dtsch.Bot.Ges., Neue Folge Nr.1, 157-166 (1962).
- und H.LORENZEN: Handling and culturing of Chlorella.
In: D.M. PRESCOTT: Methods in cell physiology, New York and London, Vol.I, 159-187 (1964).
- LOMBERG-HOLM, K.K.: A direct study of intracellular glycolysis in Ehrlich's ascites tumor.
Biochim.Biophys. Acta 35, 464-472 (1959).
- LOSADA, M. and D.I. ARNON: Selective inhibitors of photosynthesis.
In: HOCHSTER, R.H. and J.H. QUASTEL: Metabolic inhibitors, Bd. II, 559-593 (1963).
- McHARGUE, J.S.: The role of manganese in plants.
J.American Chem. Soc. 44, 1592-1598 (1922)
- McLACHLAN, G.A. and H.K.PORTER: Replacement of oxidation by light as the energy source for glucose metabolism in tobacco leaf.
Proc.Roy.Soc. 150, 460-473 (1959).
- NEISH, A.C.: Carbohydrate nutrition of Chlorella vulgaris.
Can.J.Bot. 29, 68-78 (1951).
- NELSON, N.: A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose.
J. Biol.Chem. 153, 375-380 (1944).
- PARIJA, P. and A.B. SARAN: The effect of light on the respiration of starved leaves.
Ann.Bot. 48, 347-354 (1934).

- PETRACK, B., A. CRASTON, F. SHEPPY, and F. FARRON:
Studies on the hydrolysis of adenosine triphosphate by spinach chloroplasts.
J. biol. Chem. 240, 906-914 (1965).
- and F. LIPMANN: Photophosphorylation and photohydrolysis in cell-free preparations of blue-green algae.
In: McKILROY, W.D. and B. GLASS: Light and life.
621-630 (1961).
- PIRSON, A.: Ernährungs- und stoffwechselphysiologische Untersuchungen an Fontinalis und Chlorella.
Z. Bot. 31, 193-267 (1937).
- : Manganese and its role in photosynthesis.
In: LAMB, C.A., O.G. BENTLEY and J.M. BEATTIE: Trace elements, New York and London, 81-98 (1958).
- , C. TICHY und G. WILHELM: Stoffwechsel und Mineral-
salzernährung einzelliger Grünalgen. I Vergleichende Untersuchungen an Mangelkulturen von Ankistrodesmus.
Planta 40, 199-251 (1952).
- PRINGSHEIM, E.G.: Heterotrophie bei Algen und Flagellaten.
In: W. RUHLAND: Handbuch der Pflanzenphysiologie, XI, 303-326 (1959).
- : Flora 157 (1966) im Druck..
- and W. WIESSNER: Photo-assimilation of acetate by green organisms.
Nature 188, 919-921 (1960).
- , - : Ernährung und Stoffwechsel von Chlamydothrix (Volvocales).
Arch. Mikrobiol. 40, 231-246 (1961).
- REISNER, G.S. and J.F. THOMPSON: Manganese deficiency in Chlorella under heterotrophic carbon nutrition.
Nature 178, 1473-1474 (1956).

- RIED, A.: Transients of oxygen exchange in *Chlorella* caused by short light exposures.
Carnegie Institution Year Book 64, 399-406 (1965).
- ROE, J.H. : The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent.
J.Biol.Chem. 212, 335-343 (1955).
- RUPPELT, H.G.: Untersuchungen über die Zusammensetzung von *Chlorella* bei Synchronisation im Licht-Dunkel-Wechsel.
Flora 152, 113-138 (1962).
- SHIHIRA, I. and R.W.KRAUSS: *Chlorella*, physiology and taxonomy of forty-one isolates.
University of Maryland, College Park, Maryland 1963
- SIMONIS, W. und K.H.GRUBE: Weitere Untersuchungen über Phosphathaushalt und Photosynthese.
Z.Naturf. 8 b, 312-317 (1953).
- SPOEHR, H.A. and H.W. MILNER: The chemical composition of *Chlorella*; effect of environmental conditions.
Plant Physiology 24, 120-149 (1949).
- SPRUIT, C.J.P.: Photoreduction and Anaerobiosis.
In: R.A. LEWIN: Physiology and biochemistry of algae.
New York and London, 47-66 (1962).
- STANIER, R.Y., M.DOUDOROFF, R.KUNISAWA and R.CONTOPOULOU: The role of organic substrates in bacterial photosynthesis.
Proc.Natl.Acad.Sciences 45, 1246-1260 (1959).
- SYRETT, P.J.: Nitrogen assimilation.
In: R.A.LEWIN: Physiology and biochemistry of algae.
New York and London, 171-188 (1962).
- and H.-A.WONG: The fermentation of glucose by *Chlorella vulgaris*.
Biochem.J. 89, 308-315 (1963).

TANNER, W., L.DÄCHSEL and O.KANDLER:

Effects of DCMU and Antimycin A on photo-assimilation of glucose in *Chlorella*.

Plant Physiology 40, 1151-1156 (1965).

- ,E.LOOS and O.KANDLER:

Glucose assimilation of *Chlorella* in monochromatic light of 658 and 711 m μ .

In: THOMAS, J.B. and J.C.GOEDHEER: Currents in photosynthesis, 243-251 (1966).

TAYLOR, F.J.: The absorption of D-glucose by *Scenedesmus quadricauda*. I Some kinetic aspects.

Proc. Roy. Soc. B.: 151, 400-418 (1960).

TÖDT, T.: Elektrochemische Sauerstoffmessungen. Konzentrationsmessungen oxydierender und reduzierender Stoffe durch galvanische Modellelemente. Berlin 1958.

ULRICH, W.: Vergleichende Untersuchungen an *Euglena* und *Chlorella* bei autotropher, mixotropher und heterotropher Ernährung.

Dissertation Göttingen 1963.

WARBURG, O., G. KRIPPAHL und A.JETSCHMANN:

Widerlegung der Photolyse des Wassers und Beweis der Photolyse der Kohlensäure nach Versuchen mit lebender *Chlorella* und den Hill-Reagentien Nitrat und $K_3Fe(CN)_6$.

Z.Naturf. 20 b, 993-996 (1965).

WESSELS, J.S.C. and R. VAN DER VEEN:

The action of some derivativs of phenylurethane and of 3-phenyl-1,1-dimethyl urea on the Hill-reaction.

Biochim. Biophys. Acta 19, 548.549 (1956).

WHALEY, W.G.: Growth as a general process.

in: W. RUHLAND: Handbuch der Pflanzenphysiologie, XIV, 71-112 (1961).

- WHITTINGHAM, G.P.: Induction phenomena of photosynthetic algae at low partial pressures of oxygen. J.exp.Bot. 7, 273-289 (1956).
- WIESSNER, W. : Wachstum und Stoffwechsel von Rhodospseudomonas spheroides in Abhängigkeit von der Versorgung mit Mangan und Eisen. Flora 149, 1-42 (1960).
- : Inorganic Micronutrients.
In: R.A. LEWIN: Physiology and biochemistry of algae.
New York and London, 267-286 (1962 a).
- : Kohlenstoffassimilation von Chlamydomobotrys (Volvocales).
Arch.Mikrobiol.43, 402-411 (1962 b).
- : Quantum requirement for acetate assimilation and its significance for quantum measurements in photophosphorylation.
Nature 205, 56-57 (1965).
- and H.GAFFRON: Role of photosynthesis in the light-induced assimilation of acetate by Chlamydomobotrys.
Nature 201, 725-726 (1964).
- WOLF, G.: Die Atmung von Chlorella im Verlauf der Zellentwicklung.
Dissertation Göttingen 1964.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. A. Pirson, danke ich für die Anregung dieser Arbeit und für seine stete wohlwollende Anteilnahme an ihrem Fortgang.

Herrn Dr. W. Wiessner danke ich für wertvolle Hinweise.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für Sachbeihilfen gedankt.

Lebenslauf

Am 26. Dezember 1938 wurde ich als Sohn des Landwirts Erich Lesemann und seiner Ehefrau Marianne, geborene Riediger, in Wettschütz, Kreis Glogau/Schlesien, geboren. Nach vierjähriger Grundschulzeit in Leese, Kreis Lemgo, wurde ich in die Engelbert-Kämpfer-Schule in Lemgo aufgenommen. Am mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig dieser Schule legte ich im Frühjahr 1958 die Reifeprüfung ab. Im Sommersemester 1958 begann ich das Studium der Fächer Biologie, Chemie und Geographie - später kam noch Mikrobiologie hinzu - in Göttingen. Während des Sommersemesters 1961 und im anschließenden Wintersemester studierte ich in Freiburg. Anschließend setzte ich mein Studium in Göttingen fort, wo ich im Frühjahr 1963 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Pirson am Pflanzenphysiologischen Institut meine Doktorarbeit begann.

Meine akademischen Lehrer in den Hauptfächern waren: Professor Ax, Professor Birukow, Professor Brockmann, Professor Firbas, Professor Glemser, Professor Piepho, Professor Pirson, Professor Trebst, Professor Schlegel in Göttingen; Professor Mohr und Professor Hassenstein in Freiburg.

